

01681  
291

CORRELACION DE LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) CON  
LA PRUEBA INTRADERMICA DE TUBERCULINA PPD DOBLE COMPARATIVA, EN  
EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Tesis presentada ante la  
División de Estudios Superiores de la  
Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

por

JAVIER OCADIZ GARCIA

Junio de 1988

APROBADA POR:

DR. MANUEL RAMIREZ VALENZUELA

DR. JORGE PEREZ MARTINEZ

DR. JORGE CARDENAS LARA

DR. RAUL VARGAS GARCIA

DR. EDUARDO SADA DIAZ

DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES

DR. ARTURO OLGUIN Y BERNAL

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

## R E S U M E N

OCADIZ GARCIA, JAVIER, Correlación de la Immunoelectrotransferencia (IET) con la prueba intradérmica de tuberculina PPD do--ble comparativa, en el diagnóstico de la tuberculosis bovina (bajo la dirección de MANUEL RAMIREZ VALENZUELA).

El principal objetivo de este trabajo fue comparar los resul--tados entre una prueba serológica (IET) con la prueba de tuberculina PPD doble comparativa, elaboradas a partir de Mycobacterium bovis y M. avium respectivamente, en el diagnóstico de la tuberculo--sis bovina.

Se inocularon becerros por vía intravenosa con una cepa de --campo de M. bovis: cinco con 1000 µg c/u; cuatro con 500 µg c/u y dos animales testigos. Se supuso que en respuesta a la infección experimental, se producirían anticuerpos que se conjugarían con de--terminadas bandas antigénicas formadas a partir de la electrotrans--ferencia del antígeno H37Rv (M. tuberculosis) que serían identifica--das por su diferente peso molecular (PM) y que caracterizarían la -infección por M. bovis; estas mismas bandas estarían ausentes en las pruebas con los sueros de los animales testigos.

Los resultados mostraron que las mismas bandas fueron identifi--cadas con los sueros de los animales inoculados como con los de los testigos, aunque con diferente frecuencia; esta frecuencia, sin em--bargo, no fue tan marcada como para diferenciar los animales inocu--lados de los testigos.

Previamente se realizaron revelados con sueros de vacas - PPD negativas vs, PPD positivas, y PPD negativas vs, sueros de vacas con lesiones tuberculosas confirmadas por histopatología, habiéndose obtenido resultados similares a los de los becerros del experimento.

Debido a los resultados de la IET, no fue posible inferir su especificidad, pero para la prueba de tuberculina si se obtuvo: la última de tres pruebas efectuadas en un periodo de -- 127 días, resultó negativa en los once becerros; a la necropsia de éstos no se observaron lesiones sugerentes de tuberculosis; además, de todos estos animales se enviaron muestras al laboratorio de bacteriología, habiendo resultado negativas al cultivo. Estos resultados le dan a la prueba de tuberculina doble comparativa, interpretada por criterio estricto, una especificidad del 100%, aunque se considera que el tamaño de la muestra fue pequeño (once animales).

Se concluye que la IET no fue útil en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, en comparación con la prueba de tuberculina PPD doble comparativa, que resultó altamente específica.

Adicionalmente se analizaron, en forma retrospectiva, resultados de cinco pruebas de tuberculina PPD, doble comparativa, aplicadas a un hato de vacas lecheras del Valle de México (donde

la tuberculosis bovina es enzoótica) durante un periodo de 31 meses.

Se observó que el mayor porcentaje (35%) de animales reactivos por primera vez, fue en los de 1 año de edad, disminuyendo casi uniformemente hasta los de 12 años.

En cuanto a sexo, se encontró que el 9,5% de las hembras vs. el 4,8% de los machos (de una población de 147 animales) resultaron positivos a la prueba de tuberculina; esta diferencia no fue significativa ( $\chi^2$ ).

Referente a raza, se formaron 23 parejas por edad, entre las razas Holstein y Jersey. No se encontró diferencia significativa ( $\chi^2$ ) en la susceptibilidad a la infección tuberculosa detectada con la prueba de tuberculina.

En relación con el estado de gestación, el mayor porcentaje de reacción (54%) se obtuvo en las vacas no gestantes (vacías) y menos del 10% en cada uno de los 9 meses de gestación. No se encontró diferencia significativa entre cada uno de los grupos de gestación, pero entre cada uno de éstos y el grupo de vacas vacías se encontró diferencia altamente significativa ( $\alpha=0,01$ ).

Se infiere que en el hato lechero estudiado, donde la tubercu

lisis bovina es enzoótica, la infección ocurre a temprana edad, probablemente antes del destete; que las hembras son tan susceptibles a la infección como los machos; que no hay diferencia en la susceptibilidad a la infección entre las dos razas estudiadas, y que probablemente la gestación, sobre todo en el último tercio, interfiera con la respuesta a la tuberculina.

## SUMMARY.

OCADIZ GARCIA, JAVIER. Correlation between Immunoblotting and Tuberculin PPD Comparative Test in the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. (Under the direction of MANUEL RAMIREZ VALENZUELA).

The main objective of this work was to compare results between a serological test, Immunoblotting (IBT) and the tuberculin PPD comparative test, elaborated of Mycobacterium bovis and M. avium - respectively, in the diagnosis of bovine tuberculosis.

Calves were injected I.V. with a field strain of M. bovis: five of them with 1000 µg each; four with 500 µg each and two controls. It was thought that in response to the experimental infection, antibodies could be produced and conjugated with certain antigenic protein bands from the blotting of H37Rv strain of M. tuberculosis. Those bands could be identified by their different molecular weights, thus characterizing the M. bovis infection. Such bands would be absent in the tests with the sera of control animals.

Results show that the same bands were identified with the sera - from both, inoculated and control calves, but with different frequency. This frequency however, was not enough to discriminate both groups of animals.

Previously, immunoblots were performed with sera from PPD positive vs. PPD negative cattle, and PPD negative vs. tuberculose cows confirmed by histopathology. The results obtained were similar to -

those from the experimental calves.

Due the immunoblott results, it was no possible to do any inference about the specificity of this test; not so for the tuberculin test: the last of three tuberculin tests performed in a period of 127 days, was negative for the eleven calves. No lesions sugesting tuberculosis were observed at postmorten examination in the eleven calves. Furthermore, tissue samples from all calves were bacteriologically tested, showing negative cultures; this results give the tuberculin PPD comparative test, interpreted with strict criterion, a specificity of 100%. However, the sample size must be considered -- small (eleven animals).

In conclusion, the immunoblott test was no usefull in the diagnosis of bovine tuberculosis as opposed to the tuberculin PPD comparative test, the results of which were highly specific.

In addition, results from five tuberculin tests were analyzed retrospectively; such tests were performed during a 31 month period on a milking herd in the Valley of Mexico City, where bovine tuberculosis is enzootic. It was observed that the highest percentage (35) of first time reactors occured in one year old calves. This percentage decreased almost uniformely as age increased.

In relation to sex, it was found that 9.5% of females vs. 4.8% of males from a population of 147 animals, were positive to the tu--



berculin test; this difference was not considered significant (Chi square). Likewise, no relationship was found between susceptibility to tuberculouse infection and breed, between Holstein and Jersey breeds; 46 females were paired by age and no significant difference was detected (Chi square) using the tuberculin PPD comparative test.

In relation to the reproduction state, the highest proportion of reactions (54%) was found in the non-pregnant group, and less than 10% in each of the nine pregnant groups formed by month of pregnancy. No significant difference was detected among the nine pregnant groups, however, between each one of these and the non-pregnant group, the difference was highly significative ( $\alpha=0.01$ ).

It is infered for the herd under study, that the infection occurs at an early age, probably before weaning; the females are as susceptible to the infection as the males; there is no difference in susceptibility between the two studied breeds and, probably, the pregnancy could interfere with the response of the tuberculin test, specially during the last trimester.

## DATOS BIOGRAFICOS

JAVIER OCADIZ GARCIA nació en México, D. F., el 7 de mayo de 1937. Realizó estudios de Preparatoria en la Ciudad de México, en la Escuela Nacional Preparatoria No. 3 de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.). Egresó de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., donde obtuvo el grado de Médico Veterinario Zootecnista en 1965.

De 1963 a 1965 fue investigador del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, adjunto al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias en Palo Alto, D. F., en el Departamento de Patología Animal.

De 1966 a 1972 fue Inspector Federal del Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos para Animales de la Dirección General de Sanidad Animal, de la entonces Secretaría de Agricultura y Ganadería. Durante el mismo periodo desempeñó el cargo de inspector adscrito al Rastro Frigorífico de Ferrería, por la Dirección General de Control de Alimentos y Bebidas en el Distrito Federal, de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

En 1973 fue comisionado por la Dirección General de Sanidad Animal, para estudiar la Maestría en Salud Pública, en la Escuela de Salud Pública de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, en la Ciudad de México.

De 1974 a 1975 desempeñó el cargo de Supervisor en la "American Meat Packing Corporation", en Chicago, Ill, E.U.A.

De 1976 a la fecha, es Profesor-Investigador del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, donde ha desempeñado varios cargos a nivel Licenciatura y Maestría.

De 1979 a 1980, obtuvo la Maestría en Medicina Veterinaria Preventiva, en el Departamento de Epidemiología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de California, en Davis, Cal. E.U.A.

Durante 1981 a 1982 realizó estudios de especialización, en el Departamento de Microbiología del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Iowa, en Ames, Iowa, E. U. A.

En 1983 se inscribió como estudiante de postgrado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., para obtener el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias.

De 1985 a la fecha ha sido Profesor de Epidemiología en la Maestría en Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, de la U.N.A.M.

Co-autor del libro "Glosario de Términos Zootécnicos". Publicado por la Universidad Autónoma Chapingo, 1979.

Autor del libro "Epidemiología en Animales Domésticos. Control de Enfermedades". Editorial Trillas, 1987.

## LISTA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION .....	1
Antecedentes Bibliográficos.....	4
Justificación.....	13
Objetivos.....	14
Hipótesis.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	17
RESULTADOS.....	23
DISCUSION.....	31
CONCLUSIONES.....	53
APENDICE.....	54'
CUADROS.....	55
FIGURAS.....	68
LITERATURA CITADA.....	75

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1. Resultado de las pruebas de Tuberculina PPD comparativa (de origen bovino y origen aviar) en becerros Holstein inoculados con una cepa de campo de <u>M. bovis</u> ,.....	55
2. Medias de ganancia de peso de becerros inoculados con dos dosis diferentes de <u>M. bovis</u> , - en comparación con los testigos,.....	56
3. Resultado de la tuberculinización en bovinos de raza lechera de ambos sexos, nacidos en la Granja Experimental de la UACH, en 1986.....	57
4. Resultado de la tuberculinización en bovinos de raza lechera de ambos sexos, nacidos en la Granja Experimental de la UACH, en 1985.....	57
5. Resultado de la tuberculinización en bovinos lecheros de ambos sexos, nacidos en la Granja Experimental de la UACH, en 1984.....	58
6. Resultado de la tuberculinización en bovinos de raza lechera de ambos sexos, nacidos en la Granja Experimental de la UACH entre 1984 y - 1986.....	58
7. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa - en vacas de raza lechera que nacieron en la - Granja de la UACH en 1984.....	59
8. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, - en vacas de raza lechera que nacieron en la - Granja de la UACH en 1983.....	60
9. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa - en vacas de raza lechera que nacieron en la - Granja de la UACH en 1982.....	61
10. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1981.....	62

<u>Cuadro</u>		<u>Página</u>
11.	Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1980.....	63
12.	Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1979.....	64
13.	Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, en vacas de raza lechera, que nacieron entre 1975 y 1978 en la Granja de la UACH.....	65
14.	Resultado de la prueba de tuberculina PPD doble comparativa, entre hembras de dos razas lecheras pareadas por edad. Granja UACH, 1987	66
15.	Resultado de 808 pruebas de tuberculina aplicadas a las vacas lecheras de la Granja Experimental de la UACH, durante el periodo de junio de 1984 a enero de 1987.....	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Bandas antigénicas transferidas por medio de la IET, de seis muestreos serológicos post-inoculación I.V. de 1000 µg de <u>M. bovis</u> en becerros Holstein.	68
2. Frecuencia de las bandas antigénicas transferidas de seis muestreos post-inoculación I.V. de 1000 µg de <u>M. bovis</u> en becerros Holstein, en comparación con becerros no inoculados:.....	69
3. Comparación de las medias de ganancia de peso, entre los becerros testigos y los inoculados con dos diferentes dosis de <u>M. bovis</u> .....	70
4. Frecuencia en porcentaje, de bandas transferidas de sueros de vacas PPD(-) y PPD(+). ....	71
5. Frecuencia en porcentaje, de bandas transferidas de sueros de vacas PPD(-) y sueros de vacas con lesiones tuberculosas confirmadas por Histopatología.....	72
6. Proporción de vacas positivas a la prueba de tuberculina PPD doble comparativa según su estado reproductivo.....	73
7. Edad de los animales a la primera reacción positiva a la prueba de tuberculina PPD doble comparativa....	74

CORRELACION DE LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) CON LA PRUEBA INTRADERMICA DE TUBERCULINA PPD DOBLE COMPARATIVA, EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.

1. INTRODUCCION

Nos avocamos al estudio de la tuberculosis bovina porque de seamos contribuir al conocimiento de esta enfermedad que afecta principalmente a la ganadería lechera de México y, también, debido al hecho de que hasta ahora se le ha prestado poca atención a esta importante enfermedad en nuestro país.

Según datos de la Organización Sanitaria Panamericana (OSP) (14), México reportó en 1977, una pérdida anual debida a la tuberculosis bovina, de casi 35.5 millones de dólares, habiendo sido 56% más elevada que la de Argentina que ocupó el segundo lugar en todo el Continente Americano en el año mencionado. Algunos reportes oficiales que tenemos como antecedente, son los siguientes: La Dirección General de Sanidad Animal informó a la OSP, que en 1974, de 8,313 bovinos lecheros probados con tuberculina PPD - intradérmica, 194 resultaron positivos, dando una prevalencia de reactores de 2.3% (8).

Dos años más tarde, en 1976, la misma Dirección informó que de 11,700 bovinos lecheros, 1,508 resultaron positivos, dando una prevalencia de reactores de 12.9% (9). Esta misma dependencia comunicó\* que utilizando la tuberculina PPD doble comparativa cervical, en los bovinos lecheros de la mayoría de los estados del país

\* M. V. Z. J. Orduño. Com. pers. 1984.



durante el periodo 1981-1983, se obtuyeron resultados que varia ron entre 0.4 y 13.7% de positividad. También se han realizado reportes de prevalencia esporádicos, entre los cuales tenemos -- los siguientes:

Galindo Villa y Lloret, citados por Rivera (39) encontraron en 1969, una prevalencia de rectoras a la prueba de tuberculina PPD, de 42.2% en 5,000 vacas lecheras del Distrito Federal.

En una encuesta realizada por Talavera, de la Fuente y Beruecos en 1973 (45), en 1,175 vacas Holstein pertenecientes a 6 establos lecheros del Valle de México, encontraron que, dentro de un grupo de 12 enfermedades infecciosas consideradas como cau sa de desecho, la tuberculosis constituyó el 55.2%; en otras pala bras, más de la mitad de las vacas que se desecharon por enferme dad infecciosa fue debido a la tuberculosis; los autores mencio nan que se diagnosticó la enfermedad por medio de la tuberculina.

Durán (16) en un centro de recría de ganado Holstein en Tepo zotlán, Méx. obtuvo una prevalencia de reactores a la prueba de tu berculina doble comparativa, de 5.2% en el año de 1979. Con la - misma prueba, Martínez (31), obtuvo una prevalencia del 58, 61 y 18% en tres hatos lecheros del Municipio de Altotonga, Ver., en - el año de 1982.

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa crónica,

causada principalmente por Mycobacterium bovis y en menor proporción por M. avium y M. tuberculosis. Existen numerosos trabajos que indican que estas tres especies del género Mycobacterium infectan al hombre y a los animales, ya sean domésticos o silvestres (1, 13, 17, 24, 30, 34, 40, 44, 52).

La tuberculosis bovina se considera como una zoonosis de importancia en varios países, existiendo numerosas investigaciones que indican el aislamiento de M. bovis de pacientes humanos (1, 12, 15, 34, 40).

En México son escasos los informes sobre aislamiento de M. bovis en humanos, debido a que la tipificación de bacilos tuberculosos no es una actividad frecuente, ni siquiera en los laboratorios centrales dedicados a manejar muestras provenientes de animales o de humanos (39).

En el cuadro A, se exponen diversos trabajos de aislamiento del bacilo bovino de pacientes humanos, realizados en México en diferentes años.

Cuadro A, Tuberculosis humana de origen bovino en México,

AUTORES	%	AÑO
Espinoza <u>et al</u> *	26,0 (niños) 6,8 (adultos)	1953
Olarte y Vergara (36)	26,0 (niños)	1959
Bojalil y Bastarrachea (7)	0,5	1961
Mendoza **	6,2	1974
Berlanga (5)	17,0	1974
García <u>et al</u> ***	1,0 (adultos)	1980

\* Citado por Szyfres (44)

\*\* Citado por Rivera (39)

De la información anterior se desprende que la tuberculosis bovina en nuestro país, es un problema de salud animal que tiene repercusiones económicas y de salud pública.

#### 1. Antecedes bibliográficos

Por revisión de la literatura sabemos que no hay una prueba suficientemente confiable para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. La prueba de tuberculina, en sus diversas formas de aplicación, es la que más extensamente se ha utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad en los bovinos, sin embargo, los resultados de su aplicación en varias partes del mundo son contradictorios. Por ejemplo, Toida et al (48) indican que a -

\*\*\* García, E. C., Vargas, G. R., Suárez, M. A., Vázquez, M.V., del Río, V. J. A. y Orozco, P. L.: Evaluación Epidemiológica de la tuberculosis Bovina y su Repercusión en la Patología Humana en el Valle de México. 1980, Trabajo no publicado.

pesar de que la tuberculina PPD (Derivado Proteico Purificado) se ha usado en todo el mundo como antígeno en la prueba cutánea en los programas de control de la tuberculosis, está lejos de ser un producto homogéneo y consiste en una mezcla compleja de proteína y polisacáridos.

Haagsma et al (23) en 1982 en Holanda, encontró variaciones en la potencia entre las tuberculinas PPD bovinas, incluso en tuberculinas producidas en el mismo laboratorio.

Suther et al (43) usando tuberculina de origen mamífero y tuberculina de origen aviar en forma comparativa, obtuvieron que de 193 animales sacrificados, positivos a la tuberculina, 31 de ellos estaban infectados, dando un porcentaje de sólo 16% de efectividad. Los autores no indican cómo comprobaron la infección.

Moguel et al (32) en 1982 en México, utilizando la prueba doble comparativa cervical, con tuberculina bovina y tuberculina aviar, enviaron al sacrificio 50 animales reactivos, de los cuales sólo 6 tenían lesiones sugerentes de tuberculosis, y de 12 animales positivos al cultivo bacteriológico, en ninguno recuperaron especies patógenas de Mycobacterium; los autores no indican si los 6 animales con lesiones estaban incluidos en los 12 positivos al cultivo.

En una investigación realizada por Chávez (10) en Cuba en 1983, utilizando la tuberculina PPD de origen bovino en 4,985 animales, obtuvo 273 reactores de los cuales, a la necropsia, sólo 30 se observaron con lesiones compatibles con tuberculosis, resultando 243 (89%) como falsos positivos.

En varias ocasiones se ha reportado que las micobacterias llamadas atípicas, tuberculoides o del grupo MDPT (micobacterias diferentes a las que producen tuberculosis) son responsables de las reacciones falsas positivas (32, 25).

González et al (20) mencionan que las micobacterias atípicas, se consideran como causantes de una sensibilización inespecífica en los bovinos que son investigados alérgicamente mediante pruebas de tuberculina, como resultado de las fracciones antigénicas comunes que tienen estas micobacterias con las micobacterias patógenas con que se elaboran las tuberculinas (M. bovis, M. avium y M. tuberculosis). Estos autores encontraron al sacrificio de 1,287 bovinos reactores a las tuberculinas de origen mamífero y aviar, que sólo 117 animales (9%) mostraron lesiones tuberculosas.

Vera et al (51) probaron que 9 especies diferentes del género Mycobacterium, que se refieren como atípicas, son muy comunes en los pastos y agua de los bebederos en las granjas. Estas micobacterias infectan y sensibilizan a los animales para reac-

cionar a la tuberculina, aunque no produzcan lesiones visibles.

Sánchez y Rossel (41) en un estudio realizado en Cuba, aislaron micobacterias atípicas en el 21% de 928 muestras de heces; del 13% de muestras de leche; 39% de 72 muestras de agua de beberos; 61% de 28 muestras de hierbas, y 86% de muestras de suelo y cama. Todas las muestras fueron de hatos libres de tuberculosis, en los cuales se obtuvieron reacciones a las tuberculinas PPD de origen bovino y aviar.

Se han obtenido reacciones a la prueba de tuberculina en ganado libre de tuberculosis, pero infectado con otros microorganismos ácido-resistentes, como Nocardia farcinica (3)

Un problema que se presenta también con el uso de la tuberculina es la anergia; ésta se define como la falla de un animal con evidencias de tuberculosis, en mostrar respuesta a la tuberculina al tiempo en que se realiza la lectura. Lepper et al (29) revisaron este problema en 78 vacas tuberculosas: cuarenta y seis (59%), presentaron sólo una lesión y 32 (41%) tuvieron múltiples lesiones. Nueve de las vacas anérgicas mostraron tuberculosis generalizada. Exámenes histopatológicos de lesiones de 38 animales mostraron que la enfermedad estaba en etapa progresiva.

A pesar de estos informes poco favorables para la tuberculina, al derivado proteico purificado (PPD) se le considera por ahora, el material más efectivo para ser usado en programas de control de tuberculosis, siempre que sea bien controlada y normalizada su calidad. Las tuberculinas son productos de uso generalizado en Medicina Veterinaria para el diagnóstico de la tuberculosis en los animales, siendo la tuberculina intradérmica el único método de confianza para diagnosticar la enfermedad en los bovinos (38).

Ivanov, citado por Chávez (10) considera que la tuberculina es conocida por su gran especificidad, aunque no siempre se observen lesiones macroscópicas en los animales reactivos.

La prueba de tuberculina no es perfecta, y su efectividad en el campo deberá determinarse usando criterio epidemiológico; lo más importante de este criterio es la sensibilidad (SEN) y la especificidad (ESP). Dado que los niveles de SEN y ESP pueden variar en diferentes países y áreas, es necesario llevar a cabo estudios sobre estos factores en la respuesta a la tuberculina, en áreas donde se vaya a aplicar de rutina esta prueba. Para establecer el patrón de SEN y ESP para cualquier prueba de escrutinio en particular, es necesario determinar el verdadero estado de la enfermedad en todos los animales probados. En el caso de la tuberculosis bovina, se puede establecer mediante la necropsia,

con exámenes histopatológicos y bacteriológicos de todos los animales probados (19).

Debido a que los resultados de la prueba de tuberculina no son consistentes, ésto ha llevado a los investigadores a buscar otras pruebas alternativas, como son las pruebas serológicas. Algunas de estas investigaciones han tenido como base de comparación de sus resultados, a la prueba de tuberculina.

Lepper et al (26) en 1973 en Australia, realizaron un estudio comparativo entre la prueba de floculación con bentonita y la tuberculina intradérmica. Las conclusiones a las que llegaron, fueron de que la prueba de floculación con bentonita no era una prueba eficiente para la detección de la tuberculosis en los bovinos, ya que en un trabajo, el 19% de bovinos reactivos a la tuberculina intradérmica HCSM (Medio Sintético Concentrado por Calor) fueron positivos a la prueba de floculación y, en otro el 54%. Concluyen, además, que la aplicación de la tuberculina aumenta los resultados de las pruebas serológicas como la floculación, cuando se comparan los resultados con los obtenidos con sueros de los mismos animales, antes de la aplicación de la tuberculina.

Chávez Melo (11) en 1975 en México, investigó la prueba de fijación del complemento (FC) para detectar anticuerpos contra



M. tuberculosis, habiendo concluido que, los resultados de la -- prueba intradérmica comparativa cervical con PPD, no tuvieron re lación con los obtenidos con la prueba FC; además, detectaron ma yor número de anticuerpos en los animales que habían recibido -- más tuberculinizaciones y que, aparentemente, dichos anticuerpos fueron estimulados por la tuberculina aplicada.

Thoen et al (46) en 1983 en Estados Unidos, comparó la prueba mo dificada de ELISA y la prueba intradérmica de tuberculina, ha-- biendo encontrado los resultados que se muestran en el cuadro B. Cuadro B. Comparación de resultados entre la prueba ELISA modi ficada y la tuberculina comparativa cervical en 126 bovinos.

PRUEBA DE TUBERCULINA COMPARATIVA CERVICAL				
	+	--	Total	
PRUEBA ELISA	Positivas	70	33	103
	Sospechosas	7	11	18
	Negativas	3	2	5
Total	80	46	126	

Los autores indican que la prueba ELISA tuvo éxito en detec tar 77 (70 positivos más 7 sospechosos), de los 80 animales posi tivos a la prueba de tuberculina doble comparativa, y que los 33 animales positivos a ELISA y negativos a la tuberculina, pro bablemente fueron infecciones recientes que aun no se pueden de-

tectar con la tuberculina.

Baskaya (4) en 1983 en Turquía, comparó la prueba de aglutinación en placa con la prueba de tuberculina aviar en el diagnóstico de la infección experimental de aves con M. avium. Lo que obtuvo fue que 23 de las 25 aves inoculadas, resultaron positivas a la tuberculina; cinco testigos fueron negativos a ambas pruebas. Concluye que la prueba de aglutinación es excelente en el diagnóstico de la infección por M. avium.

Vardaman et al (50) en 1964 en Estados Unidos, compararon la prueba de fijación del complemento (FC) con la tuberculina en bovinos. Los resultados que obtuvieron indican que la mitad de los animales en los que se encontraron lesiones tuberculosas post mortem, y que resultaron positivos a la tuberculina, fueron negativos a la FC. Los autores concluyen que la FC no tiene valor en identificar animales infectados, y que tiene poco valor en identificar animales aún con lesiones visibles de tuberculosis.

Lepper et al (27) compararon la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) con la de tuberculina y las lesiones post mortem. Los resultados indican que el 83% de 141 animales con lesiones tuberculosas, fue positivo a la prueba de tuberculina, mientras que el 77% fue positivo a la IFA. Concluyen que la IFA puede ser de ayuda en el diagnóstico de la tuberculosis bovina,

pero que por sí sola no ofrece ninguna ventaja sobre la prueba intradérmica de tuberculina, en el diagnóstico de rutina de todas las formas de tuberculosis en los bovinos.

En otro estudio realizado por Lepper et al (28) en 1977 en Australia, utilizaron la IFA y la floculación con bentonita, en la detección de la infección experimental I.V. en 5 becerros con M. bovis. De un total de 68 sueros muestreados después de la inoculación, sólo 38 (56%) fueron positivos a la IFA, y 30 (44%) a la floculación; sólo 18 (25%) fueron positivos a las dos pruebas en un tiempo dado. Los autores indican que esta disparidad probablemente se debe a que cada prueba identifica anticuerpos dirigidos contra diferentes componentes del bacilo tuberculoso.

Las pruebas serológicas como fijación del complemento, la floculación con bentonita, hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia indirecta y la de precipitación en gel entre otras, han sido descritas previamente para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Sin embargo, estos métodos no han tenido un uso amplio, debido a que se ha informado que tienen reacciones inespecíficas en algunos animales. Además, se ha informado que, animales que han recibido repetidas pruebas de tuberculina intradérmica, pueden desarrollar reacciones serológicas que interfieren con la interpretación de los resultados de estas pruebas (11, 27, 47).

En relación a la prueba IET, no se encontraron referencias sobre la aplicación de esta prueba para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

## 2. Justificación

Debido a que México tiene notificada ante la OSP la prevalencia más alta de tuberculosis bovina, en relación con los demás países del Continente Americano, y debido a que en nuestro país es escasa la investigación de esta importante enfermedad, pretendemos colaborar con este trabajo sobre una posible alternativa de diagnóstico para la tuberculosis bovina. Esta alternativa es la IET. Al contar con una prueba serológica con un porcentaje elevado de SEN y ESP para el diagnóstico de la tuberculosis animal, se podrían utilizar las mismas muestras de suero para investigar la presencia de anticuerpos circulantes contra otras enfermedades infecciosas que afectan al ganado bovino. Se podrían, en el futuro, establecer bancos de sueros que sirvieran para realizar investigaciones epidemiológicas sobre enfermedades infecciosas, para tener un conocimiento confiable de la existencia de éstas en el ganado.

En este trabajo se realizó también un análisis retrospectivo sobre los resultados de pruebas de tuberculina PPD doble comparativa, aplicadas a bovinos de raza lechera, en una granja donde

la tuberculosis bovina es enzoótica.

Aunque las tuberculinas elaboradas en México se producen bajo las normas de producción del Centro Panamericano de Zoonosis, con sede en Buenos Aires, Argentina, se desconocen la SEN y la ESP de estos biológicos en nuestro país, por lo que es importante determinar estos valores para poder calcular su probabilidad diagnóstica (35).

### 3. Objetivos

#### A) Objetivo terminal

Determinar el valor diagnóstico de las pruebas de IET y de tuberculina PPD doble comparativa, mediante la evaluación de la SEN y ESP de ambas pruebas, a la necropsia de los becerros del experimento.

#### B) Objetivos intermedios

a) Observar diferencias, si es que existen, en la cantidad de bandas antigénicas en los revelados de la IET, a medida que avancen los muestreos serológicos en los becerros del experimento.

b) Se buscarán diferencias en la frecuencia de bandas antigénicas, reveladas por la IET, entre los sueros de vacas tuberculosas, vacas PPD positivas y PPD negativas.

- c) Determinar si la prueba de tuberculina es capaz de identificar la infección experimental, tan temprano como a los 21 días.
- d) Se observarán probables diferencias en las respuestas a dos diferentes dosis de inoculación de M. bovis: 500 y 1000 µg, detectadas por las dos pruebas.
- e) Se evaluarán las posibles diferencias en la temperatura corporal de los becerros, antes y después de la inoculación con M. bovis.
- f) Se compararán las posibles diferencias en el peso corporal de los 3 grupos de becerros del experimento, en el transcurso del mismo.
- g) Analizar retrospectivamente pruebas de tuberculina, efectuadas durante 31 meses en el hato lechero de la UACH donde la tuberculosis bovina es enzoótica, para conocer qué grupo de edad, sexo, raza y estado fisiológico, presenta el mayor porcentaje de reactividad a la tuberculina PPD, doble comparativa cervical.

#### 4. Hipótesis

- a) La SEN y ESP de la IET, son mayores, en porcentaje,

que los valores de la prueba de tuberculina, cuando se com paran los resultados con los hallazgos post-mortem de los becerros del experimento.

b) Hay mayor cantidad de bandas antigénicas en el revelado de los sueros de los últimos muestreos que de los primeros, en los animales del experimento.

c) Se encuentran diferencias en la frecuencia de bandas antigénicas, reveladas por la IET, entre los sueros de vacas tuberculosas, vacas PPD positivas y PPD negativas.

d) La prueba de tuberculina es capaz de identificar la infección experimental de M. bovis a los 21 días.

e) Se observan diferencias en las respuestas a las dos dosis de inóculo de M. bovis; 500 y 1000  $\mu$ g, por las dos pruebas.

f) Se presentan diferencias en la temperatura corporal de los becerros, antes y después de la inoculación.

g) Se observan diferencias significativas en la ganancia y/o pérdida de peso corporal entre los tres grupos de becerros del experimento.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 1) Animales para el experimento.

En la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapin<sub>go</sub> (UACH) que se encuentra localizada al Noreste del Valle de Mé<sub>xico</sub>, se inocularon becerros de raza Holstein, con una cepa de M. bovis.

El criterio de inclusión de los becerros al experimento fue:

- a) Sexo (que fueran machos)
- b) Edad (entre 4 y 6 meses)
- c) No reactivos (que fueran negativos a la prueba de tuberculina PPD intradérmica doble comparativa).

Bajo este criterio, se obtuvieron 12 animales, los cuales se asignaron en forma sistemática, por orden de nacimiento, como sigue:

1. Becerro H 5 Testigo
2. " H16 Testigo
3. " H24 500  $\mu$ g de M. bovis
4. " H29 1000  $\mu$ g de M. bovis
5. " H31 500 " " " "
6. " H37 1000 " " " "
7. " H40 500 " " " "
8. " H41 1000 " " " "
9. " H46 500 " " " "
10. " H52 1000 " " " "



11. Becerro H56 500 µg de M. bovis.

12. " H58 1000 " " " "

Las dosis utilizadas (500 y 1000 µg) fueron determinadas por nefelometría, y fueron diluidas en 1 ml de solución salina fisiológica (s.s.f.) cada una. La cepa de M. bovis empleada se había aislado meses antes de un caso bovino en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria (F.M.V. Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.). La inoculación fue por vía intravenosa (I.V.). A los animales testigos se les inyectó 1 ml de s.s.f. I.V. a cada uno, al mismo tiempo de la inoculación a los demás becerros.

Después de la inyección, los animales testigos fueron alojados en una corraleta con piso de cemento, y los inoculados se destinaron a un corral con piso de tierra; ambos alojamientos -- distantes entre sí ( $\pm$  100 m) y aislados del resto del hato.

A 11 becerros\* se les registró la temperatura corporal cada 24 horas por vía rectal y después de 12 a 14 horas de ayuno; el registro se llevó a cabo desde tres días antes de la inoculación y hasta 20 días después de la misma.

El peso corporal de los 11 animales se registró en tres ocasiones: la primera se realizó horas antes de la inoculación;

\* Murió el H56 quince días después de la inoculación inicial.

La segunda pesada se efectuó a la mitad del experimento, 64 días después, y la última a los 127 días después de la inoculación. Siempre se pesaron después de 12-14 horas de ayuno. El peso corporal se analizó por medio de análisis de correlación, con prueba de Tuckey y prueba de Duncan.

Setenta y siete días después de la primera inoculación se efectuó una reinoculación con la misma cepa de M. bovis, repitiéndoles las dosis a los mismos animales.

Después de la primera inoculación, se les tomaron muestras de 5 ml de sangre a los 11 becerros en 11 ocasiones, con intervalos de 10 a 12 días, para obtener alícuotas de 0.5 ml de suero.

A los 11 becerros se les practicaron 3 pruebas de tuberculina PPD doble comparativa cervical, a los 21, 67 y 127 días después de la primera inoculación.

## 2) Para la prueba IET.

La IET se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Para la IET se siguieron las técnicas descritas por Gooderham (22), - Towbin (49) y Bers (5).

En este trabajo, la IET consistió, a grandes rasgos, en la electroforesis de 400 mg de antígeno H37Rv (M. tuberculosis)<sup>1</sup> en geles de poliacrilamida, y al término de ésta, las bandas de proteínas antigénicas dispersas en el gel (debido a su diferente peso molecular) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa cortadas a una medida de 14 x 11 cm. Posteriormente, cada membrana se cortó en tiras de 4 mm de ancho x 11 cm de largo, y cada una de éstas se incubó, en tubos de ensaye, con una alícuota de 0.5 ml de suero bovino que se deseaba investigar si contenía anticuerpos contra M. bovis. En este trabajo se utilizó como segundo anticuerpo un reactivo (1:400) anti-IgG<sup>2</sup> para detectar la molécula completa (Ig G<sub>1</sub> e Ig G<sub>2</sub>) del suero bovino. Al final de este proceso, se revelaron las bandas de las tiras<sup>3</sup>, para hacer visibles las proteínas antigénicas que reaccionaban con los anticuerpos (IgG) originados por la infección de micobacterias en los bovinos.

Fueron analizados mediante la IET los sueros provenientes de los becerros inoculados experimentalmente, así como los de grupos de vacas PPD negativas, PPD positivas y vacas con lesiones tuberculosas confirmadas por histopatología.

<sup>1</sup> No hubo disponible M. bovis.

<sup>2</sup> SIGMA Chemical Co. P.O. Box 14508, St. Louis MO 63178 U.S.A.

<sup>3</sup> Fórmula para el revelado:  
30 mg de 4-Orto-1-Cloronaftol,  
10 ml de alcohol metílico  
50 ml de Buffer (PBS Sol. 1<sup>x</sup>)  
50 µl de Peróxido de Hidrógeno Q.P.

3) Análisis retrospectivo de pruebas de tuberculina.

Complementariamente, y en función de la IET, se analizaron resultados de 147 pruebas de tuberculina PPD doble comparativa cervical, interpretada con criterio estricto, en bovinos de 5 a 25 meses de edad, de ambos sexos, en los que no estaban comprendidas hembras gestantes. Al mismo tiempo se analizaron los resultados de 808 -- pruebas de tuberculina, con las mismas características del grupo anterior, pero practicadas a vacas lecheras en producción. Estas 808 pruebas se efectuaron en cinco periodos, en el mismo hato lechero, durante un periodo de 31 meses. En este hato la tuberculosis bovina es enzoótica.

En el hato lechero citado, se utilizaron las tuberculinas elaboradas en México por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). La tuberculina PPD de M. bovis es elaborada en una concentración de 50,000 U.I./ml (5,000 U.I./0.1 ml) y la PPD elaborada a partir de M. avium, con 25,000 U.I./ml. (2,500 U.I./0.1 ml).

La prueba de tuberculina se había realizado en todos los casos, como prueba intradérmica doble comparativa\* en la región cervical de los bovinos, inyectando 0.01 ml de cada tuberculina y efectuando la lectura después de 72 horas de su aplicación. La eva

\* Si la medición con el vernier registra 2 mm. o más en la reacción a la bovina en comparación con la aviar, se considera positiva (+); si la diferencia es de 1 mm se considera como sospechosa (S), y si la diferencia es de 2 mm. o más a favor de la aviar, se considera negativa a tuberculosis bovina, pero positiva a la infección con micobacterias diferentes a M. bovis como por ejemplo, al complejo MAIS (M. avium-M. intracellulare-M. scrofulaceum) o micobacterias del grupo MPT (M). Si no hay reacción a ninguna de las dos tuberculinas, entonces se considera negativa.

luación fue con criterio estricto, según lo recomendado por la Campaña Contra la Tuberculosis Bovina en México (38).

La susceptibilidad a la infección tuberculosa, de las razas Holstein y Jersey, se analizó mediante la prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para significancia.

En un rastro del Estado de México se muestrearon ganglios mediastínicos y sangre de vacas sospechosas de tener tuberculosis. Los ganglios se remitieron al Laboratorio de Patología de la F.M.V.Z. para su estudio y, después de obtener los sueros, se dividieron en alícuotas de 0,5 ml y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas para analizarlos mediante la IET. Los sueros de vacas PPD negativas y PPD positivas, se obtuvieron del hato lechero de la UACH.

### III. RESULTADOS

#### 1) De los becerros inoculados.

En relación con la IET, en la fotografía 1, (pág.68) se exponen 6 de los 11 muestreos serológicos que se realizaron durante el experimento. Se excluyeron los muestreos 2, 3, 5 y 6, con la finalidad de observar mayores diferencias en estos lapsos de tiempo. Se puede observar que la banda de 24 Kd claramente va apareciendo más marcada en los tres o cuatro últimos muestreos de los cinco becerros inoculados con la dosis de 1000 µg.

Las tres primeras tiras que se muestran en el lado izquierdo de la fotografía (A, B y C) corresponden a sueros de becerros recién nacidos, y como se puede ver, muestran menos bandas antigénicas que los becerros testigos del experimento (tiras D y E). Es de notarse, que uno de los 2 becerros testigos, el H5 que corresponde a la tira D, resultó consistentemente positivo a la tuberculina aviar (MDPT)\* y sin embargo, se observan menos bandas antigénicas y menos marcadas que las que se observan del suero del otro becerro testigo (H16) que corresponde a la tira E, el cual resultó negativo en las tres tuberculinizaciones postinoculación (ver cuadro 1 (pág. 55)).

En la fotografía se puede observar también que las bandas de 67, 66, 34 y 32 Kd (a, b, c, d, de la gráfica 1) se encuentran casi en todos los muestreos de los animales inoculados y en los sueros de los becerros no inoculados.

\* MDPT=Micobacterias diferentes a las que producen tuberculosis.

La gráfica 1 (pág.69) expone la frecuencia de aparición de las bandas antigénicas, obtenidas de los becerros del experimento en 6 muestreos postinoculación intravenosa de 1000  $\mu$ g de *M. bovis*.

Como se puede observar en la gráfica, la banda de 22 Kd apareció en forma exclusiva en el 23% de los animales inoculados y no en los testigos. De las bandas restantes, sólo las de 46 y 48 Kd tienen una diferencia más acentuada entre animales inoculados y los testigos: la de 46 Kd apareció en el 70% de los becerros inoculados, contra 20% en los testigos y la de 48 Kd, que la mostraron el 50% de los inoculados, se detectó en el 20% de los testigos. Todas las demás bandas no tienen una marcada diferencia entre los dos grupos de becerros.

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos a la prueba comparativa de PPD, en los becerros inoculados experimentalmente. Los becerros testigos (H5 y H16) consistentemente resultaron negativos a la PPD bovina en las tres pruebas postinoculación. El becerro H56 murió a los 15 días de la inoculación, por una infección diarreica; las muestras que se le tomaron resultaron negativas a tuberculosis. Como se puede observar en el cuadro 1, a la prueba realizada 21 días después de la inoculación, 3 (H37, H52, H58) de los 5 becerros inoculados con 1000  $\mu$ g de *M. bovis* (60%) mostraron reacción sospechosa a la prueba intradérmica, y sólo 1 inoculado con 500  $\mu$ g (H24) mostró la misma reacción sospechosa (25%).

Para la segunda prueba intradérmica practicada a los 67 días de la inoculación, 3 de los becerros inoculados con 1000  $\mu$ g resultaron francamente positivos (H41, H52 y H58) y otro (H29) reaccionó como sospechoso a la PPD bovina (25%).

Se les repitió la inoculación a los becerros, 77 días después de la primera con la misma cepa y con las mismas dosis a los mismos animales, de tal manera que se esperaba ver el aumento en la respuesta que tendría esta repetición en las bandas detectadas por la IET y la respuesta a una tercera prueba de tuberculina 50 días después.

Para la tercera prueba de tuberculina practicada, el 100% de los becerros inoculados resultó negativo y a la necropsia de los animales efectuada 10 días después de esta prueba, no se observaron lesiones compatibles con tuberculosis en ganglios ni en órganos; de todas formas se tomaron muestras para bacteriología, habiendo resultado negativas al cultivo.

En el cuadro 2 se observa la diferencia en la ganancia de peso entre los tres grupos de animales del experimento. Esta diferencia resultó significativa entre los 3 grupos en las 2 pesadas postinoculación ( $\alpha=0.05$ ).

La gráfica 2 (pág.70) esquematiza esta relación.



Respecto a la temperatura corporal de los becerros del experimento, las mediciones se realizaron hasta 20 días después de la primera inoculación y luego se suspendieron, debido a que no se observó ninguna diferencia con la temperatura de los becerros antes de la inoculación.

Después de la reinoculación, se volvió a tomar la temperatura en las condiciones descritas, durante 10 días, no habiendo encontrado diferencias con las temperaturas previas a la reinoculación.

2) De la prueba IET en vacas PPD(-), PPD(+) y vacas tuberculosas.

En la primera prueba realizada con la IET, se analizaron 21 sueros de vacas PPD negativas vs. 71 sueros de vacas PPD positivas (ver gráfica 3). Cada banda que se muestra en la gráfica está identificada por su peso molecular (P.M.) expresado en kilodaltones (Kd). Se puede observar que la banda de 24 Kd, se obtuvo en el 55% de los sueros PPD positivos, contra una frecuencia aproximada de 9% en los PPD negativos.

La banda de 28 Kd, aparece en forma exclusiva para los sueros positivos, pero con una frecuencia baja (15%).

Otras bandas que mostraron diferencias en su frecuencia entre

las vacas PPD positivas y las PPD negativas, fueron las de 37, - 60, 71, 73, 82, 83 y 85 Kd. En la gráfica se observan 4 bandas (67, 66, 34 y 32 Kd), que se revelaron con un patrón semejante - en todos los grupos muestreados. Estas bandas están señaladas - con las letras a, b, c, d.

En la gráfica 4 (pág.72) se exponen las mismas bandas de los sueros de las 21 vacas PPD negativas, de la gráfica 3, pero ahora comparando su frecuencia, contra la de las bandas obtenidas con - los sueros de 27 vacas tuberculosas, confirmadas por histopatolo- gía. Se puede observar que la banda de 24 Kd apareció en el 30% de las vacas tuberculosas como se observa en la gráfica, en compa- ración con el 9% de las PPD negativas. La banda de 28 Kd, volvió a aparecer en forma exclusiva en los sueros de las vacas tubercu- losas, pero sólo en el 4% de ellas.

De las otras bandas que aparecieron con una diferencia en su frecuencia, que se exponen en la gráfica 3, la de 37 Kd disminuyó su frecuencia de aparición del 45% en las vacas PPD positivas, al 7% en las tuberculosas; lo mismo sucedió con la banda de 53 Kd, - que de 70% bajó a 27% en las tuberculosas.

Por el contrario, la banda de 60 Kd que apareció en el 27% - de las PPD positivas, se mostró en el 35% de las tuberculosas. - Las bandas de 71 y 73 Kd, que mostraron diferencia en su frecuen-

cia a favor de las PPD positivas, (Gráfica 3) aparecieron en las vacas tuberculosas con una frecuencia casi igual de baja que en las PPD negativas (Gráfica 4). Por último, las bandas de 82, 83 y 85 Kd que aparecieron en el 44, 60 y 70% de los animales PPD positivos respectivamente, se mostraron con una frecuencia más baja (las de 82 y 85 Kd) que las de vacas PPD negativas, como se puede ver en la gráfica 4. En esta última gráfica, aparecen dos pares de bandas (a-b y c-d) con un P.M. correspondiente de 67, 66, 34 y 32 Kd. Estas dos últimas bandas (34 y 32 Kd) aparecen con una frecuencia de más del 90%, tanto en las PPD positivas como en las tuberculosas; no así las de 67 y 66 Kd, las que aumentaron de 53 y 44% de las PPD positivas a 93 y 89% de las vacas tuberculosas. La frecuencia de las mismas bandas de los sueros de las vacas PPD negativas, fueron de 61, 52, 62 y 72% para las bandas a, b, c y d respectivamente.

La banda de 55 Kd, apareció en las 2 gráficas con un porcentaje muy parecido: 86 y 88%. Desafortunadamente, también aparece en un porcentaje elevado de las PPD negativas (77%), por lo que no es útil en la diferenciación entre las vacas supuestamente sanas y las enfermas de tuberculosis.

### 3. Del análisis retrospectivo de las pruebas de tuberculina.

Se analizaron los resultados de 147 tuberculinizaciones aplicadas a 42 machos de raza lechera, que tenían una edad entre 5 y 25

meses, y a 105 hembras de la misma edad pero que aun no estaban gestantes. Se registraron las reacciones a las dos tuberculinas y los resultados se pueden observar en los cuadros 3 a 5 -- (págs.57-58). El cuadro 6 (pág.58) resume los datos contenidos en los tres cuadros precedentes.

Se analizaron también los resultados de 808 tuberculinizaciones practicadas a vacas en producción, agrupadas por año de nacimiento. Los resultados se exponen en los cuadros 7 a 13 -- (págs.59-65). Estos muestran la prevalencia momentánea, la incidencia y la prevalencia para el periodo comprendido entre la primera y la última prueba, efectuadas en cada grupo de edad.

El cuadro 14, muestra la reactividad a la tuberculina PPD, de 46 hembras bovinas de las razas Holstein y Jersey, pareadas por edad, de todas las edades disponibles en la granja de la UACH.

La proporción de rectoras de la raza Holstein fue de 48% (11/23), y para la Jersey de 39% (9/23). Los resultados se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ), para ver si había diferencia significativa en cuanto a la susceptibilidad a la infección tuberculosa, pero no se encontró significancia.

El cuadro 15 muestra las proporciones de vacas que resultaron positivas, sospechosas y negativas a la prueba de tuberculina, en relación con su estado reproductivo: G1-G9 indican los me

ses de gestación que tenían las vacas al momento de hacerles la prueba. Los resultados se muestran también en la gráfica 5, donde se observa que el 54% de las rectoras se encontraban no gestantes y las reacciones restantes (46%) se repartieron en un porcentaje menor al 10%, en cada grupo de gestación.

La edad que tenían los animales al momento en que resultaron positivos por primera vez a la tuberculina, se expone en la gráfica 6 (pág.74). El mayor porcentaje de reacción (36%) se observó en los becerros de 1 año de edad, disminuyendo gradualmente conforme avanzaba la misma.

#### IV, DISCUSION

La fotografía 1 que sirvió de base para elaborar la gráfica 1, está tomada directamente de las tiras de membrana nitrocelulosa y muestra las bandas reveladas de los sueros de 6 muestreos postinoculación de 1000  $\mu$ g de M. bovis en 5 de los becerros del experimento, como se mencionó anteriormente. En revelados previos, se observó que no había diferencia en las bandas obtenidas de los sueros de los 4 becerros inoculados con la dosis de 500  $\mu$ g, cuando se compararon con aquéllos, por lo que, en ahorro de espacio, no se tomaron en consideración.

De todas las bandas que se observan en la fotografía 1, la de PM más bajo (22 Kd) apareció en las tiras correspondientes a los últimos muestreos de los becerros inoculados y no en los testigos; sin embargo, su aparición no es muy marcada, sugiriendo con esto que se trata de un antígeno débil.

La banda de 24 Kd, aparece bien definida sobre todo en los 2 ó 3 últimos muestreos de los 5 becerros inoculados, pero la presencia de esta banda antigénica en las tiras de los becerros no inoculados, invalida la posibilidad de su consideración para el diagnóstico. También se puede observar, que las tiras correspondientes a los becerros no inoculados, muestran aproximadamente la misma cantidad y definición de bandas que las tiras de los becerros inoculados, lo que sugiere que se trata de anticuerpos originados por infecciones de micobacterias no patógenas (MDPT), ya que a la necropsia de los becerros no se encontraron lesiones su-

gerentes de tuberculosis. Esto indica también, que la IET no fue capaz, en nuestro trabajo, de identificar cambios en el nivel de inmunoglobulinas G a través del tiempo, ni como consecuencia de la reinoculación. A pesar de que los becerros estaban confinados, se puede observar toda la serie de antígenos detectados por los anticuerpos de los becerros inoculados así como de los no inoculados. Esto sugiere, en ausencia de lesiones tuberculosas, que las micobacterias no patógenas son capaces de sensibilizar a los animales y producir anticuerpos que confunden y dificultan el diagnóstico serológico de la tuberculosis.

En este sistema (IET) se utilizó como segundo anticuerpo, anti-IgG bovina, que reacciona con la molécula completa (IgG1 e IgG2) de esta inmunoglobulina en los bovinos, y por esta razón tal vez se hubiera logrado una mejor identificación de bandas usando para la electroforesis, una cepa de M. bovis en vez de la H37Rv de M. tuberculosis utilizada; sólo que Ivanyi et al (24 a) en trabajos que han realizado con anticuerpos monoclonales en Inglaterra, han demostrado que no hay diferencias antigénicas notables entre M. tuberculosis H37Rv, M. bovis y M. africanum y que inclusive se pueden agrupar entre sí.

Respecto a la IET, efectuada con los sueros de las vacas de la UACH, el 55% de las vacas PPD(+) mostraron anticuerpos contra la banda antigénica de 24 Kd, sin embargo, el 9% de las vacas PPD(-)

también mostraron anticuerpos contra el mismo antígeno (ver gráfica 3). Lo anterior significa que esta banda, a pesar de tener -- una diferencia mayor entre PPD(+) y PPD(-), no es útil per se para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, y la banda de 28 Kd, por su baja frecuencia en las vacas PPD(+) (15%), tampoco se considera útil para la identificación clínica de la enfermedad.

De toda la gama de antígenos revelados por la IET, como se -- puede observar en la gráfica 3, las bandas que obtuvieron diferencias en su frecuencia entre animales PPD(+) y PPD(-) son las de PM de 37, 53, 60, 71, 73, 82, 83 y 85 Kd. La presencia de estas bandas demuestra la existencia de un mosaico antigénico por parte de Mycobacterium, y en un trabajo futuro no sería práctica la purificación de ninguno de estos antígenos, puesto que no caracterizan -- la infección tuberculosa con una alta frecuencia. Resultados semejantes encontró Ivanyi en Inglaterra en 1987, en la población humana con la misma técnica\* .

En donde se podría esperar una definición más clara, sería en la comparación de las vacas PPD(-) con las vacas con tuberculosis confirmada por histopatología (gráfica 4); sin embargo, la frecuen

\* Ivanyi, J. Dept. of Exp. Imm. The Wellcome Res. Labs. Beckenham, Kent, U.K. Investigación por publicarse.



cia de las bandas de las vacas PPD(+) se nulificaron en las vacas con lesiones tuberculosas; la única que persistió fue la de 24 Kd, aunque con una frecuencia más baja (30%), siendo menor que en las PPD(+). Este suceso probablemente se deba al hecho de que las vacas PPD(+) fueron de un solo hato, mientras que las vacas con lesiones tuberculosas provenían de diferentes zonas del Valle de México; ésto sugiere que las micobacterias están ampliamente difundidas en el valle y que probablemente hay diferencias en el grado de exposición entre las vacas.

En la gráfica 4 se observa que no hay una banda antigénica que pudiera, por su frecuencia, caracterizar la enfermedad en los bovinos. Las bandas de 35, 43, 60, 69 y 70 Kd, aunque tienen diferencias en su frecuencia a favor de las vacas tuberculosas, no son suficientemente altas.

La gráfica 4 muestra también cuatro bandas (a, b, c, d) que aparecen con un patrón semejante en todos los revelados de sueros positivos y negativos, y por lo tanto se descartan para el diagnóstico.

Una de las hipótesis planteadas en este trabajo, fue que se encontrarían diferencias en la dosis-respuesta y que serían detectadas por ambas pruebas (la tuberculina y la IET) en los becerros inoculados experimentalmente. Lo anterior resultó claro para la prueba de tuberculina, como se puede observar en el cuadro

1 (pág.55), donde se nota que 4 de los 5 becerros inoculados con la dosis de 1000  $\mu$ g (80%) reaccionaron con la tuberculina de origen bovino, en la segunda prueba realizada 67 días después de la primera inoculación, mientras que sólo 1 de los 4 becerros inoculados con 500  $\mu$ g (25%) reaccionó con el mismo biológico en la misma segunda prueba.

Se les práctico una tercera prueba de tuberculina a los becerros 60 días después de la segunda prueba y los resultados fueron opuestos a lo que se esperaba; el 100% de los becerros reinoculados resultó negativo a la prueba; ésta se comparó con la necropsia y los resultados del cultivo, habiendo sido ambos negativos.

Estos resultados sugieren que, probablemente la primera inoculación de M. bovis, aparte de sensibilizar a los becerros, les confirió cierta inmunidad, la cual fue suficiente como para eliminar al M. bovis reinoculado 67 días después. A este respecto, Youmans (53) textualmente indica que "desde hace mucho se reconoce que una vez que los animales son infectados con bacilo tuberculoso, se vuelven mucho más resistentes a la reinfección. Además, los animales, incluyendo el hombre, que son vacunados con bacilos vivos de cepas atenuadas, como la BCG o la H37Ra, adquieren una mayor resistencia a la infección. Este estado de inmunidad activa adquirida, se caracteriza no sólo por un aumento en la capacidad de los macrófagos para destruir bacilos tuberculosos, sino -

también por el desarrollo por parte de estas células de una habilidad de inhibir la multiplicación intracelular de este parásito".

Las siguientes razones nos sugieren que la cepa que se utilizó para la inoculación de los becerros en este trabajo, se comportó probablemente como una cepa atenuada:

1º Se había aislado 1 año antes de un becerro con lesiones tuberculosas, y se había resembrado varias veces.

2º Las dosis inoculadas 1000 y 500 µg fueron utilizadas previamente por De Lisle y Col. en Nueva Zelandia, para inocular venados con una cepa de M. bovis aislada de un caso bovino. En todos los casos, los venados murieron por tuberculosis entre los 20 y 30 días posteriores a la inoculación, a pesar de que, al momento de la inyección intravenosa, los venados tenían un peso corporal equiparable con los becerros de nuestro trabajo, los cuales también fueron inoculados por la misma vía. En relación con esto último, se puede pensar en una probable mayor susceptibilidad de los venados al bacilo bovino, pero fuera de esto, lo que probablemente ocurrió en nuestro trabajo, fue que nuestra cepa se comportó como una cepa vacunal, atenuada por las diferentes resiembras, ya que la cantidad inyectada sensibilizó al 80% de los becerros inoculados, pero no produjo ninguna lesión en ellos. Aunque consideramos que el tamaño de la muestra fue pequeño en nuestro tra

bajo (11 becerros) de todos modos la especificidad obtenida por la tuberculina en la tercera prueba fue del 100% coincidiendo con la opinión de Ivanov, citado por Chávez (10) en que la tuberculina PPD se reconoce por su gran especificidad.

Respecto a la temperatura corporal de los becerros del experimento, no se observó ningún cambio en los valores pre o postinoculación. Este hecho apoya la suposición de que la cepa inoculada estaba atenuada y/o de que las dosis utilizadas no fueron suficientes como para producir alteraciones en la temperatura; o bien pudo haberse presentado alguna elevación leve pocas horas después de la inoculación, la cual desapareció antes de las 24 hs. cuando se realizó la primera medición postinoculación.

Aparte de observarse el efecto de la dosis-respuesta en la prueba de tuberculina, se observó también en el peso corporal de los becerros (Cuadro 2) (pág. 56). Como se puede ver en la gráfica 2 (pág. 71) las tres mediciones se efectuaron con intervalos de tiempo semejantes: 64 y 63 días.

De acuerdo a la gráfica 2, la reinoculación tuvo un efecto más marcado en los becerros inoculados con 500  $\mu$ g. Como se mencionó en los resultados, se encontró significancia estadística ( $\alpha=0.05$ ) entre los grupos inoculados en relación con los becerros control en las dos mediciones post-inoculación.

Respecto al análisis retrospectivo de las pruebas de tuberculina, tenemos que, de acuerdo con Francis (19), la sensibilización por M. avium, M. paratuberculosis y muchos otros bacilos del grupo MDPT, puede ser detectada por la tuberculina de M. avium, más que por la tuberculina de M. tuberculosis o M. bovis, y esta diferencia sirve de base para realizar la prueba doble comparativa.

En el cuadro 3, se observa que en los becerros de ambos sexos, y en los dos grupos de edad, las reacciones se presentaron únicamente en el sitio de aplicación de la tuberculina de origen aviar; reaccionaron 9 de 48 animales (19%). Grange (21) indica a su vez, que las micobacterias tienen varios tipos de antígenos citoplásmicos, dos de los cuales son:

- a) Los que pertenecen a las micobacterias de rápido desarrollo y también al género Nocardia y,
- b) Los que pertenecen a las micobacterias de lento desarrollo.

Es posible que en la granja, donde la tuberculosis bovina es enzoótica, demostrada por cultivo<sup>\*</sup>, los becerros menores de 1 año, se infecten temprano con micobacterias patógenas así como con las del grupo MDPT,

\*

García, E. C.; Vargas, G. R.; Suárez, M. A.; Vázquez M. V., Del Río, V. J. A. y Orozco, P. L. Evaluación Epidemiológica de la Tuberculosis bovina y su Repercusión en la patología Humana, en el Valle de México. Investigación inédita.

Las patógenas como M. tuberculosis, M. bovis y M. avium, -- pertenecen al grupo de micobacterias de lento desarrollo mientras que M. fortuitum, M. chelonae ( que también son patógenas para el hombre y los animales, pero no producen la enfermedad clásica) y otras micobacterias saprófitas como M. smegmatis, M. phlei, M. vaccae, M. flavescens, y M. gilvum entre otras, pertenecen al grupo de crecimiento rápido (21). Probablemente la tuberculina de M. avium reaccione ante la sensibilización temprana con estas últimas micobacterias, y que tiempo después, el organismo animal ya responda ante la infección de micobacterias patógenas, específicamente con M. bovis que, como ya se indicó, es de lento desarrollo y sólo entonces reaccione con la tuberculina específica.

Por otra parte, Youmans (53) indica que el tiempo de aparición de la reacción de hipersensibilidad, dependerá del número de bacilos tuberculosos que infecten a un animal o a una persona, y también de la tasa de multiplicación del bacilo. Lo anterior nos sugiere que las micobacterias del grupo MDPT, al ser de rápido desarrollo, tienen una tasa de multiplicación elevada en comparación con las micobacterias patógenas, siendo así detectadas por la tuberculina de M. avium.

En el cuadro 4 se observa otra vez la predominancia de las reacciones a la tuberculina aviar en ambos grupos de edad: 23% en los de 13 a 18 meses de edad, y 10% en los de 19 a 25. Se puede

notar también, que 2 de los 16 becerros machos (13%) del grupo de 13-18 meses, ya reaccionaron con la tuberculina de origen bovino; en los machos de 19 a 25 meses no se observó reacción a ninguna tuberculina, seguramente debido al pequeño número analizado: dos becerros. Los resultados del cuadro 4 también nos sugieren una infección temprana, probablemente antes del destete, tanto en micobacterias del grupo MDPT como con patógenas, dado que el mayor porcentaje de reacciones ocurrió en los más jóvenes.

El cuadro 5 muestra que las becerras nacidas en el primer semestre de 1984, muestran un elevado porcentaje de reactoras a la tuberculina bovina: 69% (9 de 13); éstas se pueden contrastar con las becerras que nacieron en el segundo semestre de 1984, en las que sólo 1 de 22 (5%) reaccionó con la tuberculina de M. bovis.

. Una explicación posible para esta diferencia tan marcada, es la diferencia de edad en ambos grupos, concordando con las observaciones ya expresadas para los resultados del cuadro 3, en que a mayor edad de los animales, la infección por M. bovis, que es de lenta evolución, llegue a un umbral en que sea posible detectarla por medio de la tuberculina específica.

Se podría sospechar de la tuberculina, pero ésta fue aplicada el mismo día con el mismo lote del biológico, a la mayor parte del hato.

Otra posible causa de la diferencia de los resultados del -- cuadro 5, sería lo inherente a la aplicación de la prueba. Los -- resultados pueden estar influenciados, entre otras cosas por las siguientes:\*

- a) Diferencia en el sitio anatómico de inoculación.
- b) Confusión con el sitio de aplicación, cuando la prueba es comparativa
- c) Diferencia en la cantidad inoculada
- d) Diferencia en el tiempo de lectura
- e) Diferencia de individuo a individuo entre la aplicación del reactivo y la lectura

En nuestro caso, como quedó explicado con anterioridad, todas las pruebas de tuberculina reportadas en este trabajo, se hicieron en forma comparativa en la tabla del cuello de los animales, la lectura se realizó a las 72 hs y la interpretación fue -- con criterio estricto. Además, la aplicación del biológico y la la lectura de la prueba fueron realizados por el mismo individuo, de tal manera que la variación que pudo haber ocurrido por esta -- causa, fue menor.

En los cuadros 3, 4 y 5, es de notarse también, que la mayor proporción de reacciones a las dos tuberculinas correspondió a las

\* Com. pers. Dr. José Rodríguez Torres, Consultor en Salud Pública Veterinaria OPS/OMS



hembras en todos los grupos de edad, con excepción del grupo de 15 a 20 meses del cuadro 5, en el que no hubo machos para contrastar. Si se resumen los datos de los 3 cuadros en un sólo grupo de edad, para los dos sexos, quedan como se observa en el cuadro 6 (pág.58).

Aunque los números de hembras y machos analizados no fueron semejantes (105 vs 42) al obtener los porcentajes se elimina esa diferencia. Los resultados positivos a las dos tuberculinas por parte de las hembras, nos sugieren que probablemente haya susceptibilidad de sexo por parte de estas últimas; ésto se observa más claramente en la tuberculina de origen aviar (19,0% vs 2,3%) más que en la de origen bovino (9.5% vs 4.8%). Naturalmente que para afirmar que existe una susceptibilidad como la que se ha indicado, es necesario contar con un mayor número de observaciones. Esto está reportado por Hoyt et al citados por Youmans (53) quienes indican que, dentro de una especie dada de animal, se ha mostrado que las hembras son más susceptibles que los machos a la infección tuberculosa. Sin embargo, en este trabajo no se encontró significancia estadística en la susceptibilidad a la enfermedad entre ambos sexos ( $X^2$ ).

En el cuadro 7 se pueden observar los resultados a tres pruebas de tuberculina aplicadas a las hembras nacidas en 1984, para obtener la prevalencia momentánea, estimar la incidencia, y la pre

valencia para el periodo de 16 meses que hay entre la primera y la tercera pruebas. La prueba que se les aplicó en septiembre de 1985 (ver cuadro 5) es la primera que está indicada en el cuadro 7.

Según Morton y Hebel (33) la incidencia mide la aparición de la enfermedad, mientras que la prevalencia mide la existencia de la misma; es decir, la incidencia significa nuevos casos y prevalencia significa todos los casos. La incidencia es una medida dinámica de la enfermedad, mientras que la prevalencia es una medición estática.

La prevalencia y la incidencia obtenidas en el cuadro 7, claramente caracterizan la cronicidad de la infección, o sea prevalencia alta estable, 30-32%, e incidencia baja 3-6%.

De acuerdo con Aranda ( 2 ) la prevalencia para un periodo determinado no es la suma de las prevalencias momentáneas, sino que se deben descontar los casos que ya hayan sido considerados. En el caso del cuadro 7, la prevalencia para el periodo de septiembre de 1985 a enero de 1987 (16 meses) es de:

$$p = \frac{12}{95} = 13\%$$

Desde nuestro punto de vista, la prevalencia para un periodo determinado, que podríamos llamar prevalencia global, es una medición adecuada de la enfermedad, porque considera únicamente

la prevalencia inicial (número de casos diagnosticados con la primera prueba) y posteriormente sólo los casos nuevos (incidencia). Además, toma en consideración un periodo de estudio más prolongado, y tiene menor variabilidad que las dos medidas que la forman: la prevalencia momentánea y la incidencia.

En la primera prueba no se puede calcular la incidencia, debido a que se ignora el estado anterior de los animales con respecto a la infección; a esto se debe que en todos los cuadros de resumen, la incidencia en la primera prueba es cero.

En el cuadro 8, se nota claramente cómo la prevalencia momentánea aumenta considerablemente entre los periodos de prueba, a partir de la de julio de 1985; de esta fecha al mes de abril de 1986 (nueve meses) la prevalencia momentánea se triplica, y la incidencia se cuadruplica en el mismo periodo. En el periodo de abril de 1986 a enero de 1987, la prevalencia aumentó en un 17% (de 26 a 43%), y la incidencia aumentó en 11% (de 8 a 19%). Se puede observar también, que estas dos medidas de la morbilidad (prevalencia e incidencia) van aumentando conforme los animales van avanzando en edad, de tal manera que los porcentajes más altos se obtuvieron cuando las vacas tenían entre 3 y 4 años de edad (enero 87).

Asimismo, se observa en el cuadro 8, que el número (n) de las vacas probadas en cada periodo, tiende a bajar, lo cual es

natural. Si nada más se observara aumento en la prevalencia, pero la incidencia permaneciera más o menos constante, se podría decir que la disminución (desecho) se debería a problemas ajenos a la tuberculosis, y que se estarían concentrando en la granja las vacas infectadas, pero como también existe aumento progresivo en la incidencia, esto nos indica que a través del tiempo, van apareciendo casos nuevos de la infección, los cuales aumentan directamente la prevalencia; ésta se mantiene alta debido a la baja mortalidad, lo que significa cronicidad de la infección. Como ya se mencionó con anterioridad, la enfermedad es enzoótica en esta granja y, además, no hay un programa de control.

La prevalencia global obtenida para este grupo de vacas, fue de 12%, lo cual es muy similar a la obtenida para las vacas nacidas en 1984: 13% (cuadro 7).

En el cuadro 9 se observa que la prevalencia tiene mucha variabilidad entre prueba y prueba, siendo que el grupo de vacas (n) permanece casi constante. No es fácil explicar la razón por la que, en la tuberculinización realizada en marzo de 1985, la prevalencia obtenida sea del 27%, y en la prueba practicada cuatro meses más tarde, en el mismo grupo de animales, sea de cero. Como se mencionó anteriormente, el procedimiento de la prueba fue siempre el mismo, y la aplicación del biológico y la interpretación fueron realizadas por la misma persona. En este caso específico podría sospecharse que el reactivo no estuviera normalizado,

y en este caso podría haber cambios en la sensibilidad y especificidad del biológico entre lote y lote, tal como lo informa -- Haagsma (24). Sin embargo, la tuberculina empleada en una fecha determinada, se adquiriría para realizar la prueba en todo el hato lechero de la granja, y es de notarse que en otros grupos de -- edad sí se obtuvieron reacciones con el mismo biológico, como -- puede observarse en los cuadros 6, 8, 9 y 11, respecto a la prueba realizada en julio de 1985. Resulta difícil encontrar una explicación lógica para este fenómeno, aparte de la falla de la tuberculina en sí, porque tratándose de la tuberculosis, que es -- una enfermedad de lenta evolución en el organismo animal, es poco aceptable que los animales se infecten y se recuperen en un -- periodo de tiempo tan corto como cuatro meses, que es la separación entre las pruebas de marzo y julio de 1985 (cuadro 9).

Se observa en el mismo cuadro 9, que a partir de la prueba de abril de 1986, la prevalencia y la incidencia van aumentando paulatinamente; para la prueba de abril, la prevalencia es igual a la incidencia (2%) dado que la única reactiva observada, fue caso nuevo. La prevalencia global para el periodo de 22 meses, fue de 9%; puede verse que no hay mucha variabilidad entre este porcentaje y los obtenidos en otros grupos de edad (12-13%).

En el cuadro 10, se puede ver que el número de vacas (n) -- no disminuyó mucho en este grupo de hembras nacidas en 1981, a --

lo largo de los 22 meses considerados. Lo que se observa en este cuadro, es que 8 de las vacas rectoras que se obtuvieron en marzo de 1985, ya no reaccionaron 4 meses después, en la prueba de julio del mismo año, a esto se debe que la prevalencia haya disminuido del 45% (10/22) al 9% (2/22); no se identificaron casos nuevos en julio de 1985. Por eliminación de una vaca no rectora, la prevalencia en abril de 1986 fue de 10% (2/21); tampoco hubo casos nuevos en esta fecha, sino que las 2 vacas rectoras persistieron desde la prueba de marzo de 1985. Para la última prueba aplicada a este grupo de vacas (enero de 1987) se habían desechado 2 animales PPD negativos más, disminuyendo el número a 19. Para esta fecha apareció un caso nuevo, siendo la incidencia de 5% (1/19), este caso, sumado a las 2 rectoras crónicas, dieron una prevalencia momentánea de 16% (3/19). La prevalencia global para este grupo de vacas que tenían una edad entre 5 y 6 años en enero de 1987, fue de 13%, mostrando una vez más la poca variabilidad en esta medición de la morbilidad.

En el cuadro 11 se registra una prueba más de tuberculina, la de junio de 1984. Se observa que el número de vacas no disminuyó considerablemente a lo largo de 31 meses desde la primera prueba realizada (junio de 1984) hasta la última (enero de 1987). La prevalencia no fue consistente, notándose el porcentaje más bajo (20%) en la prueba de julio de 1985, la que se discutió para el cuadro 9. La incidencia tuvo una variación desde 0 hasta 15%. Esto indica que a pesar de la edad que tenían las vacas du

rante este periodo, seguían apareciendo casos nuevos, aún conviviendo por largo tiempo con vacas que se consideran como focos de infección, lo cual sugiere que probablemente se debe a diferencias en la resistencia individual.

Se calcula que el 95% de las transmisiones de M. bovis entre bovinos estabulados, ocurre por inhalación, así que es muy alta la probabilidad de adquirir la infección en estas condiciones -- (18). La prevalencia global se muestra estable (12%) a pesar de considerar un periodo de tiempo más largo que en los grupos anteriores (31 meses).

El cuadro 12 muestra que las vacas que nacieron durante 1979, fueron desechadas progresivamente a lo largo del periodo de 31 meses. En este hato, el porcentaje más alto de desecho se debe a problemas reproductivos y ocasionalmente por otras causas. Se observa también, que tanto la prevalencia como la incidencia muestran altibajas marcadas entre prueba y prueba. En este grupo de edad se solvió a presentar el problema que se observó en las vacas nacidas en 1982 (ver cuadro 9) que del 27% de rectoras que se obtuvieron en marzo de 1985, bajó a cero para julio del mismo año (4 meses después). Es posible que parte del problema radique en la variación de potencia de la tuberculina bovina utilizada, como quedó indicado en la discusión del cuadro 9. La prevalencia e incidencia obtenidas en las pruebas de abril de 1986 y enero de 1987, muestran un porcentaje que es esperado para un ha

to donde la tuberculosis es enzoótica. En este grupo de edad, la prevalencia global para los 31 meses considerados, fue de 16%, la cual resultó un poco más elevada que en los grupos anteriores.

En el cuadro 13, se expone la prevalencia e incidencia obtenidas en vacas que tenían entre 9 y 12 años de edad en enero de 1987. Se puede ver que la prevalencia es semejante a la obtenida en vacas que eran 7 a 10 años más jóvenes (ver cuadros 7 a 10). En el cuadro 13 se puede ver que, en este grupo de edad, en un periodo de 18 meses (julio 85-enero 87) la población descendió a la mitad, de 26 a 13 vacas; ésto es natural tratándose de vacas consideradas "viejas" para la producción lechera en nuestro medio. En el mismo periodo de tiempo, la prevalencia momentánea aumentó del 15 al 38%. Aparentemente, el desecho de vacas no rectoras, es la causa de que la prevalencia aumente en esa proporción, pero se puede ver que la incidencia es más elevada que en las vacas más jóvenes, lo que indica que aún a esa edad aparecen casos nuevos (reactoras). Es posible que algunas de estas vacas, en edad temprana se hayan infectado con cepas de Mycobacterium y que por su poco número o por su poca virulencia los animales se recuperaron de la infección, pero desarrollaron inmunidad al mismo tiempo que sensibilidad a la tuberculina; también es posible que esta sensibilidad la hayan perdido tiempo antes de que se les practicara la primera prueba de tuberculina (junio de 1984) y que por reinfecciones posteriores a esta fecha, aparezcan como casos nuevos (reactoras). Como indica Youmans (53), la persistencia de la hipersensi



bilidad a la tuberculina dependerá de la persistencia de bacilos tuberculosos en el organismo.

El cuadro 14, muestra la sensibilidad a la infección tuberculosa de las 2 razas principales de vacas lecheras que existen en la granja de la UACH. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) y no se encontró significancia estadística en la susceptibilidad a la infección por Mycobacterium entre las dos razas.

El cuadro 15 expone los resultados de 808 pruebas de tuberculina, realizadas a las vacas de la granja de la UACH, y relacionadas con su estado reproductivo. Se puede observar que en el periodo de 31 meses, se obtuvo el 21% de rectoras, el 6% de sospechosas y el 73% de negativas. Si consideramos que fueron entre 3 y 5 pruebas las que se realizaron en todo el hato durante casi 3 años, podemos decir que estos resultados son más realistas que los que puede dar un solo corte de prevalencia; así pues, podríamos llamarle a este resultado (21%) prevalencia justa.

Podríamos sumar el 6% de sospechosas a las positivas, ya que según Francis (18) las sospechosas tarde o temprano se convierten en positivas, pero nuestras observaciones no concuerdan con las de este investigador, cuando menos en este trabajo,

En relación con el estado reproductivo de las vacas, se pue

de ver que el porcentaje más alto (54%) correspondió a las hembras no gestantes y que el 46% restante se repartió con menos del 10% en cada uno de los 9 meses de gestación, observándose que a partir del sexto mes, el porcentaje de positividad a la prueba disminuyó gradualmente (Ver cuadro 15 y gráfica 5). A este respecto, Outteridge (37) indica que es bien conocido que los corticosteroides aumentan en la circulación sanguínea en las vacas cercanas al parto, y ésto puede tener un efecto inhibitor en la estimulación linfocitaria (que a su vez es la base de la respuesta de hipersensibilidad tardía a la tuberculina). También indique que, por experiencias de campo, se sabe que las vacas cercanas al parto pueden dar resultados negativos a la prueba de tuberculina, y ésto es un factor que hay que considerar al realizar la prueba.

La gráfica 6 muestra que, en este caso particular, en los bovinos menores de 1 año y hasta los de 12 años, ocurren infecciones atribuibles a M. bovis; sin embargo, el mayor porcentaje de reacción a la tuberculina (36%) se observó en los becerros de 1 año de edad. Esto sugiere que estos animales se infectan probablemente antes del destete, pero, como ya se discutió en los cuadros 3 a 5, la tasa de reproducción de M. bovis es lenta en comparación con las micobacterias no patógenas, y sólo después de varios meses ya alcance un umbral en el que se puede detectar con la tuberculina específica. En la misma gráfica 6, se observa cómo disminuye el porcentaje de reactivos por primera vez, confor-

me avanza la edad, particularmente en los cuatro primeros años. Resulta difícil encontrar una explicación lógica para las infecciones que son detectadas por primera vez en las vacas adultas, ya que, como se explicó anteriormente, se encuentran en una granja donde la tuberculosis bovina es enzoótica. Probablemente suceda como en otras enfermedades, en que hay un número de individuos que son naturalmente resistentes a una enfermedad determinada, pero no a la infección; o bien, que se trate de infecciones recurrentes, sin que se lleguen a presentar signos de la enfermedad; o también a la variación en la SEN y ESP de la tuberculina, o a reacciones cruzadas con otros microorganismos que pronto desaparecen del hospedero, o tal vez se presenten todos estos factores.

## V. CONCLUSIONES

En nuestro trabajo, la IET no resultó útil para el diagnóstico serológico de la tuberculosis bovina.

Probablemente en un experimento con ambiente controlado, se pudieran evitar las múltiples infecciones de micobacterias saprófitas o no patógenas, que producen anticuerpos que detectan varias bandas antigénicas, transferidas mediante la IET, que dificultan la identificación de bandas que probablemente caractericen la infección por M. bovis. Probablemente también, se hubieran obtenido diferencias específicas en la frecuencia de las bandas antigénicas, utilizando anti-IgG1 o anti-IgG2 como segundo anticuerpo.

La prueba intradérmica de tuberculina PPD doble comparativa, resultó con una especificidad del 100%; sin embargo, se considera que el tamaño de la muestra fue pequeño (11 becerros).

No se encontraron diferencias dosis-respuesta detectadas por la IET; sin embargo, sí fueron detectadas por la prueba de tuberculina: la dosis de 1000  $\mu$ g sensibilizó al 80% de los animales, mientras que la de 500  $\mu$ g sólo al 25% de los inoculados.

El efecto dosis-respuesta se observó también en la pérdida de peso: se encontró diferencia significativa ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre los tres grupos de becerros en las 2 mediciones post-inoculación.

El mayor porcentaje de reacciones a la prueba de tuberculina (35%) se obtuvo en los becerros de 1 año de edad.

No se observó diferencia significativa en la susceptibilidad a la infección por Mycobacterium, entre hembras y machos de una población de 147 animales ( $\chi^2$ ).

Tampoco se observó diferencia significativa ( $\chi^2$ ) en la susceptibilidad a la infección tuberculosa, entre las dos razas estudiadas (Holstein y Jersey), detectada mediante la prueba de tuberculina.

En cuanto al estado reproductivo, el mayor porcentaje de reacción (54%) se obtuvo en el grupo de vacas no gestantes, en 808 pruebas de tuberculina realizadas en vacas en producción.

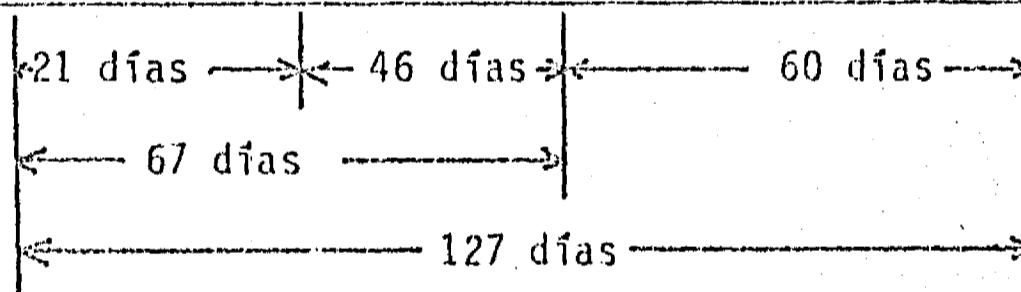
Se concluye también, que la tuberculosis bovina en el hato estudiado, tiene una prevalencia de reactoras a la prueba de tuberculina del 21% en vacas en producción lechera. Esta prevalencia, en promedio, se obtuvo en cinco periodos de pruebas efectuadas durante 31 meses.

A P E N D I C E

CUADRO 1. Resultado de las pruebas de tuberculina PPD comparativa (de origen bovino y de origen aviar) en becerros Holstein inoculados con una cepa de campo de M. bovis. Granja Experimental de la UACH. 1987.

Bece rro No.	Tuberculi- nización previa	Dosis ( $\mu$ g)	TUBERCULINIZACIONES			
			1/a	2/a	Reinocul.	3/a
H5	Negativo	0	MDPT	MDPT	0	MDPT
H16	Negativo	0	Neg.	Neg.	0	Neg.
H24	"	500	Sosp.	POSIT.	500	Neg.
H29	"	1000	MDPT	Sosp.	1000	MDPT
H31	MDPT	500	MDPT	Neg.	500	Neg.
H37	Negativo	1000	Sosp.	Neg.	1000	Neg.
H40	"	500	Neg.	Neg.	500	Neg.
H41	"	1000	Neg.	POSIT.	1000	Neg.
H46	"	500	MDPT	Neg.	500	MDPT
H52	"	1000	Sosp.	POSIT.	1000	Neg.
H56*	"	500	—	—	—	—
H58	MDPT	1000	Sosp.	POSIT.	1000	MDPT

\* Murió 15 días después de la inoculación



POSIT. = Reacción igual o mayor de 2 mm a la tuberculina bovina  
 MDPT = Reacción mayor a la aviar en comparación con la bovina  
 Sosp. = Reacción menor de 2 mm a la tuberculina bovina  
 Neg. = No reacción en ambos sitios de inoculación

CUADRO 2. Medias de ganancia de peso de becerros inoculados con dos dosis diferentes de M. bovis, en comparación con los testigos. Granja Experimental de la UACH.  
1987

No. de Becerros	Peso Previo (Kg)	Inoculación	1/a. Pesada Post-inoculación	2/a. Pesada Post-inoculación
2	113	Placebo	178	213
4	92	500 µg	138	152
5	83	1000 µg	112	129





CUADRO 3 RESULTADO DE LA TUBERCULINIZACION EN BOVINOS DE RAZA LECHERA DE AMBOS SEXOS, NACIDOS EN LA GRANJA EXPERIMENTAL DE LA UACH, EN 1986.

		Sexo	Número analizado	Reacción a:		Edad agrupada al 2-II-87. (Meses)
				Bovina(%)	Aviar(%)	
Semestre	1	♀	21	0	7 (33)	7 - 13
		♂	13	0	1 (8)	
de	2	♀	8	0	1 (12)	5 - 6
		♂	6	0	0	
Nacimiento			48			

CUADRO 4 RESULTADO DE LA TUBERCULINIZACION EN BOVINOS DE RAZA LECHERA DE AMBOS SEXOS, NACIDOS EN LA GRANJA EXPERIMENTAL DE LA UACH, EN 1985.

		Sexo	Número analizado	Reacción a:		Edad agrupada al 2-II-87 (Meses)
				Bovina(%)	Aviar(%)	
Semestre	1	♀	10	0	1 (10)	19-25
		♂	2	0	0	
de	2	♀	31	0	7 (23)	13-18
		♂	16	2 (13)	0	
Nacimiento			59			

CUADRO 5. RESULTADO DE LA TUBERCULINIZACION EN BOVINOS LECHEROS DE AMBOS SEXOS, NACIDOS EN LA GRANJA EXPERIMENTAL DE LA UACH EN 1984.

Semestre de Nacimiento	Sexo	Número Analizado	Reacción a:		Edad Agrupada (meses) al 3-IX-85
			Bovina (%)	Aviar (%)	
1	♀	13	9 (69)	2 (15)	15 - 20
	♂	0	0	0	
2	♀	22	1 (5)	2 (9)	9 - 14
	♂	5	0	0	
		40			

CUADRO 6. RESULTADO DE LA TUBERCULINIZACION EN BOVINOS DE RAZA LECHERA DE AMBOS SEXOS, NACIDOS EN LA GRANJA DE LA UACH ENTRE 1984 y 1986

Sexo	Número Analizado	Reacción a:		Grupo Unico de edad (meses)
		Bovina (%)	Aviar (%)	
♀	105	10 (9.5)	20 (19.0)	5 - 25
♂	42	2 (4.8)	1 (2.3)	
		147		

CUADRO 7. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja - de la UACH en 1984.

	FECHA	DE LAS	PRUEBAS
	Sept. 85 (n=33)	Abril 86 (n=31)	Enero 87 (n=31)
Prevalencia momentánea	30% (10/33)	32% (10/31)	32% (10/31)
Incidencia	0	3% (1/31)	3% (1/31)
Prevalencia global (16 meses)	—	—	13% (12/95)
	← 7 meses		← 9 meses →

CUADRO 8. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1983.

	FECHA . . . . . DE LAS . . . . . PRUEBAS			
	Marzo 85 (n=49)	Julio 85 (n=45)	Abril 86 (n=50)	Enero 87 (n=37)
Prevalencia momentánea	16% (8/49)	9% (4/45)	26% (13/50)	43% (16/37)
Incidencia	0	2% (1/45)	8% (4/50)	19% (7/37)
Prevalencia global (22 meses)	—	—	—	12% (22/181)

← 4 meses → ← 9 meses → ← 9 meses →

CUADRO 9. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja - de la UACH en 1982.

	FECHA DE LAS PRUEBAS			
	Marzo 85 (n=52)	Julio 85 (n=52)	Abril 86 (n=50)	Enero 87 (n=41)
Prevalencia momentánea	27% (14/52)	0 (0/52)	2% (1/50)	10% (4/41)
Incidencia	0	0	2% (1/50)	7% (3/41)
Prevalencia global (22 meses)	—	—	—	9% (18/195)

CUADRO 10. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1981.

	FECHA DE LAS PRUEBAS			
	Marzo 85 (n=22)	Julio 85 (n=22)	Abril 86 (n=21)	Enero 87 (n=19)
Prevalencia momentánea	45% (10/22)	9% (2/22)	10% (2/21)	16% (3/19)
Incidencia	0	0	0	5% (1/19)
Prevalencia global (22 meses)	—	—	—	13% (11/84)

CUADRO 11. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1980.

	FECHA		DE LAS		PRUEBAS	
	Junio 84 (n=22)	Marzo 85 (n=22)	Julio 85 (n=20)	Abril 86 (n=20)	Enero 87 (n=18)	
Prevalencia momentánea	23% (5/22)	36% (8/22)	20% (4/20)	30% (6/20)	39% (7/18)	
Incidencia	0	14% (3/22)	0	15% (3/20)	6% (1/18)	
Prevalencia global (31 meses)		—	—	—	12% (12/102)	
	← 9 meses	—*	4 meses	—*	9 meses	—*

CUADRO 12. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comperativa, en vacas de raza lechera que nacieron en la Granja de la UACH en 1979.

	FECHA					DE LAS	PRUEBAS
	Junio 84 (n=15)	Marzo 85 (n=14)	Julio 85 (n=13)	Abril 86 (n=12)	Enero 87 (n=9)		
Prevalencia momentánea	0	43% (6/14)	0	17% (2/12)	33% (3/9)		
Incidencia	0	43% (6/14)	0	17% (2/12)	22% (2/9)		
Prevalencia global (31 meses)	—	—	—	—	16% (10/63)		



CUADRO 13. Dinámica de la infección tuberculosa, detectada por la tuberculina PPD doble comparativa, en vacas de raza lechera, que nacieron entre 1975 y 1978 en la Granja de la UACH.

	FECHA DE LAS PRUEBAS				
	Junio 84 (n=19)	Marzo 85 (n=26)	Julio 85 (n=26)	Abril 86 (n=19)	Enero 87 (n=13)
Prevalencia momentánea	11% (2/19)	23% (6/26)	15% (4/26)	37% (7/19)	38% (5/13)
Incidencia	0	15% (4/26)	0	26% (5/19)	23% (3/13)
Prevalencia global (31 meses)	—	—	—	—	14% (14/103)

CUADRO 14. Resultado de la prueba de tuberculina PPD doble comparativa, entre hembras de dos razas lecheras pareadas por edad. Granja UACH, 1987.

	PPD		Total
	+	-	
Holstein	11	12	23
Jersey	9	14	23
	20	26	46

CUADRO 15. RESULTADO DE 808 PRUEBAS DE TUBERCULINA APLICADAS - A LAS VACAS LECHERAS DE LA GRANJA EXPERIMENTAL DE LA UACH, DURANTE EL PERIODO DE JUNIO DE 1984 A ENERO DE 1987.

ESTADO RE-PRODUCTIVO	POSITIVAS	SOSPECHOSAS	NEGATIVAS
No gestantes	93	17	281
G1	8	6	38
G2	6	0	37
G3	11	3	24
G4	15	1	33
G5	9	2	39
G6	14	3	37
G7	9	6	26
G8	5	5	41
G9	3	3	33
Totales	173	46	589 = 808

Proporción de positivas =  $173/808 = 21\%$

Proporción de sospechosas =  $46/808 = 6\%$

Proporción de negativas =  $589/808 = 73\%$

Proporción relativa de reacción según el estado reproductivo:

No gestantes =  $93/173 = 54\%$

G1 =  $8/173 = 5\%$

G2 =  $6/173 = 3\%$

G3 =  $11/173 = 6\%$

G4 =  $15/173 = 9\%$

G5 =  $9/173 = 5\%$

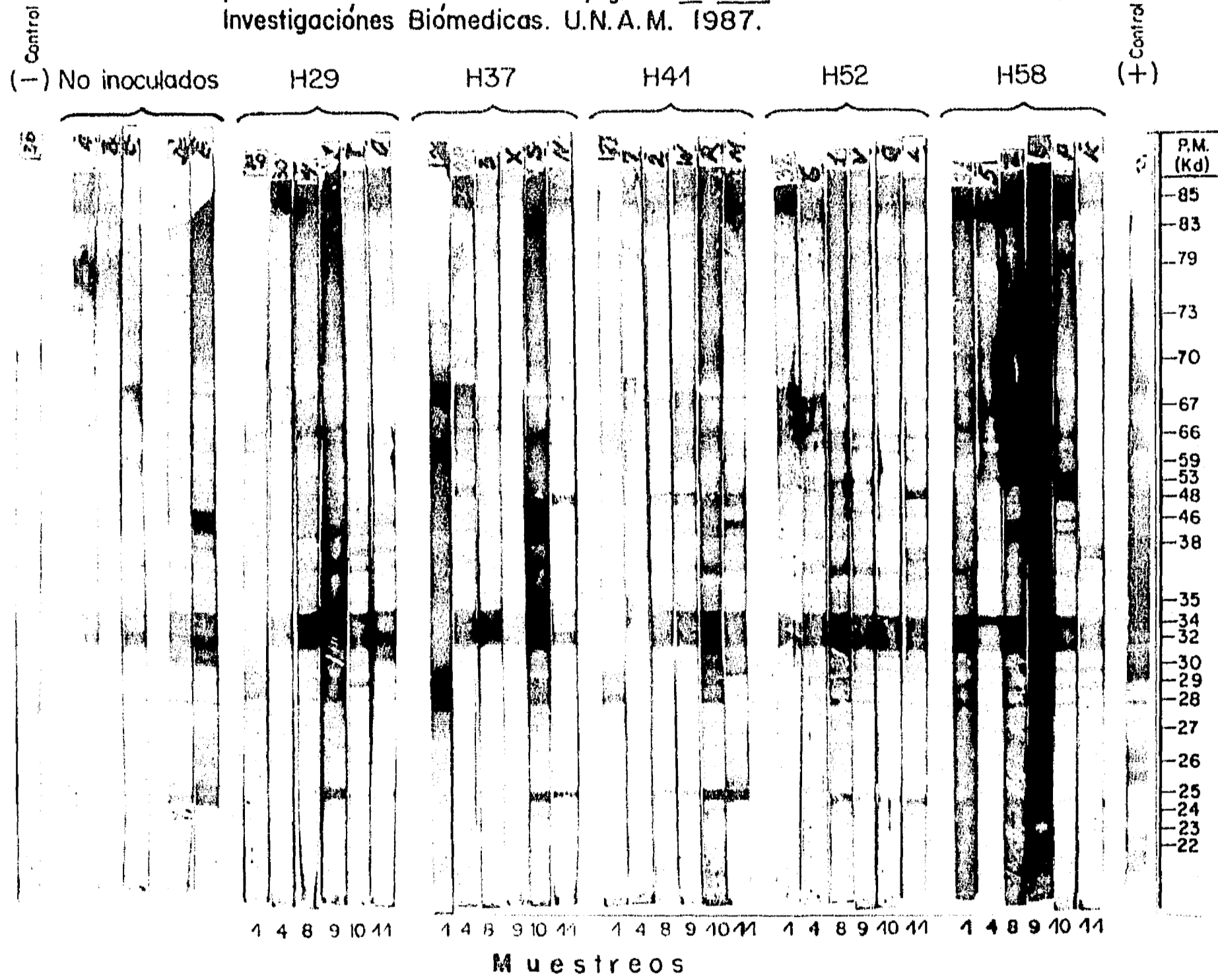
G6 =  $14/173 = 8\%$

G7 =  $9/173 = 5\%$

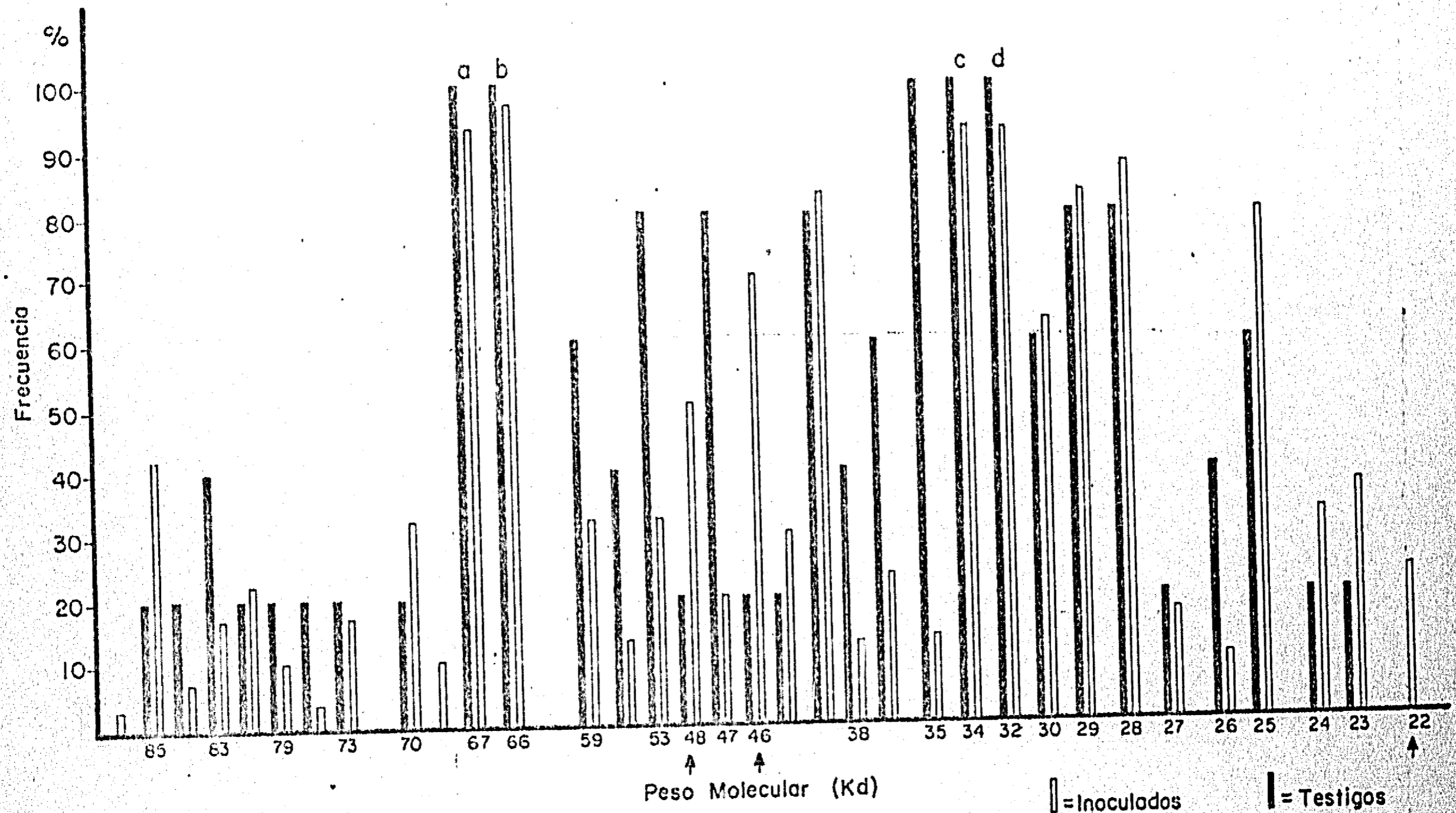
G8 =  $5/173 = 3\%$

G9 =  $3/173 = 2\%$

Fotografía 1. Bandas antigénicas transferidas por medio de la IET, de seis muestras serológicas post-inoculación I.V. de 1000  $\mu$ g. de *M. bovis* en becerros Holstein. Instituto de Investigaciones Biológicas. U.N.A.M. 1987.



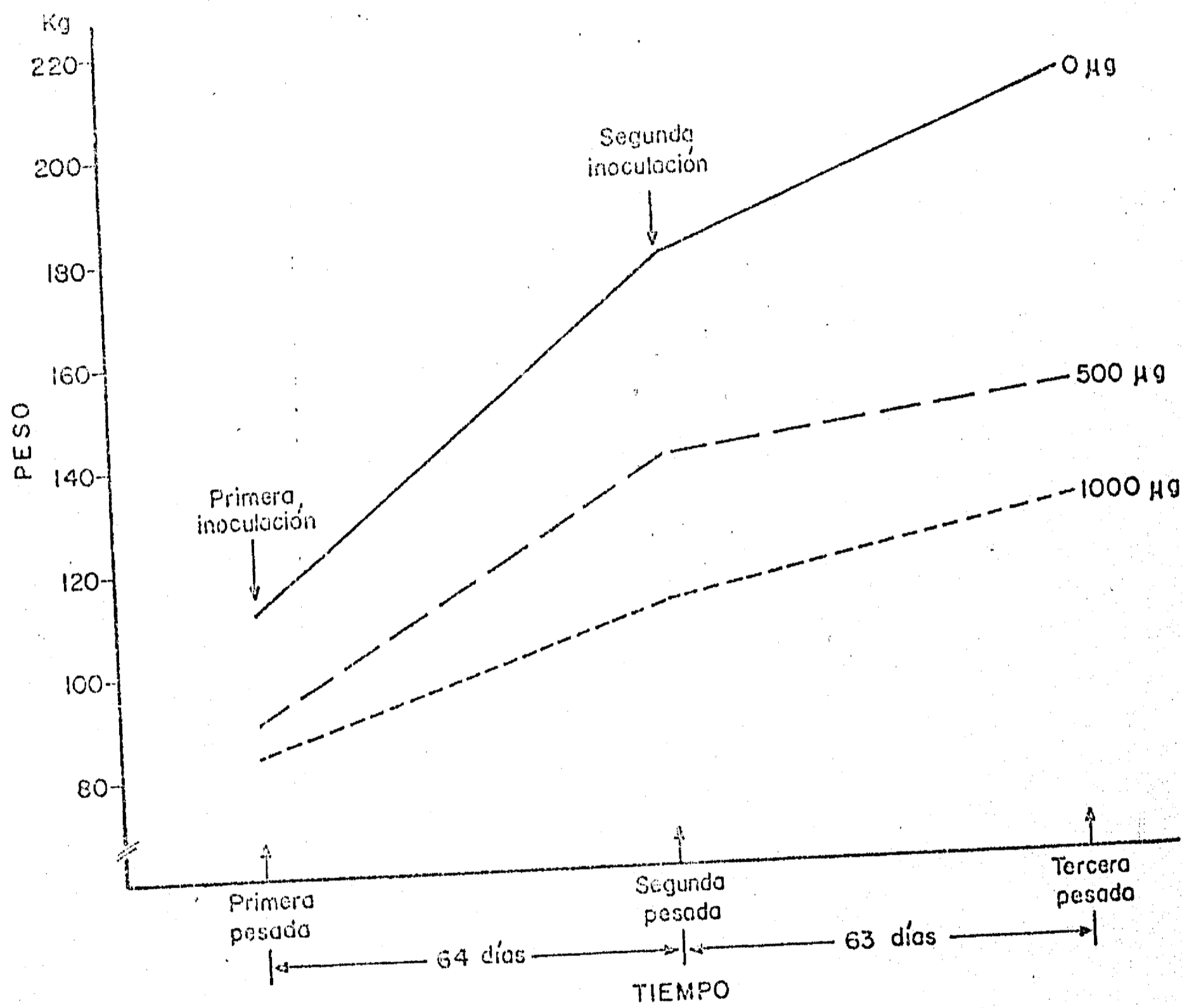
Gráfica 1. Frecuencia de las bandas antigénicas transferidas de seis muestras post-inoculación I.V. de 1000  $\mu$ g. de *M. bovis* en becerros Holstein, en comparación con becerros no inoculados. Instituto de investigaciones Biomedicas, U.N.A.M., 1987.



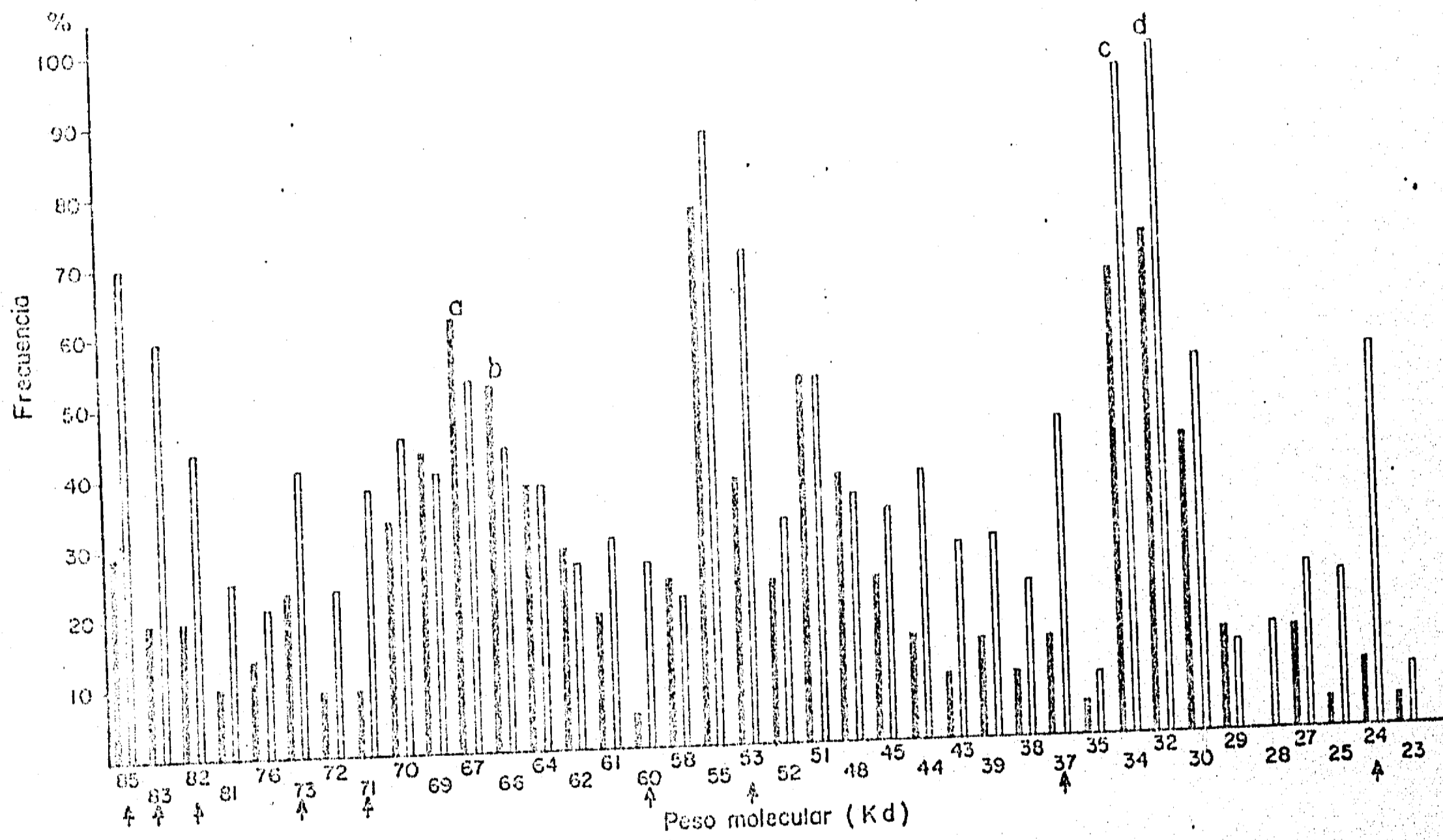
FUENTE: Fotografía 1

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gráfica 2. Comparación de las medias de ganancia de peso, entre los becerros testigo y los inoculados con dos diferentes dosis de M. bovis. Granja experimental de la U.A.Ch. 1987.



Gráfica 3. Frecuencia en porcentaje, de bandas transferidas de sueros de vacas PPD - y PPD + Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M. 1987.

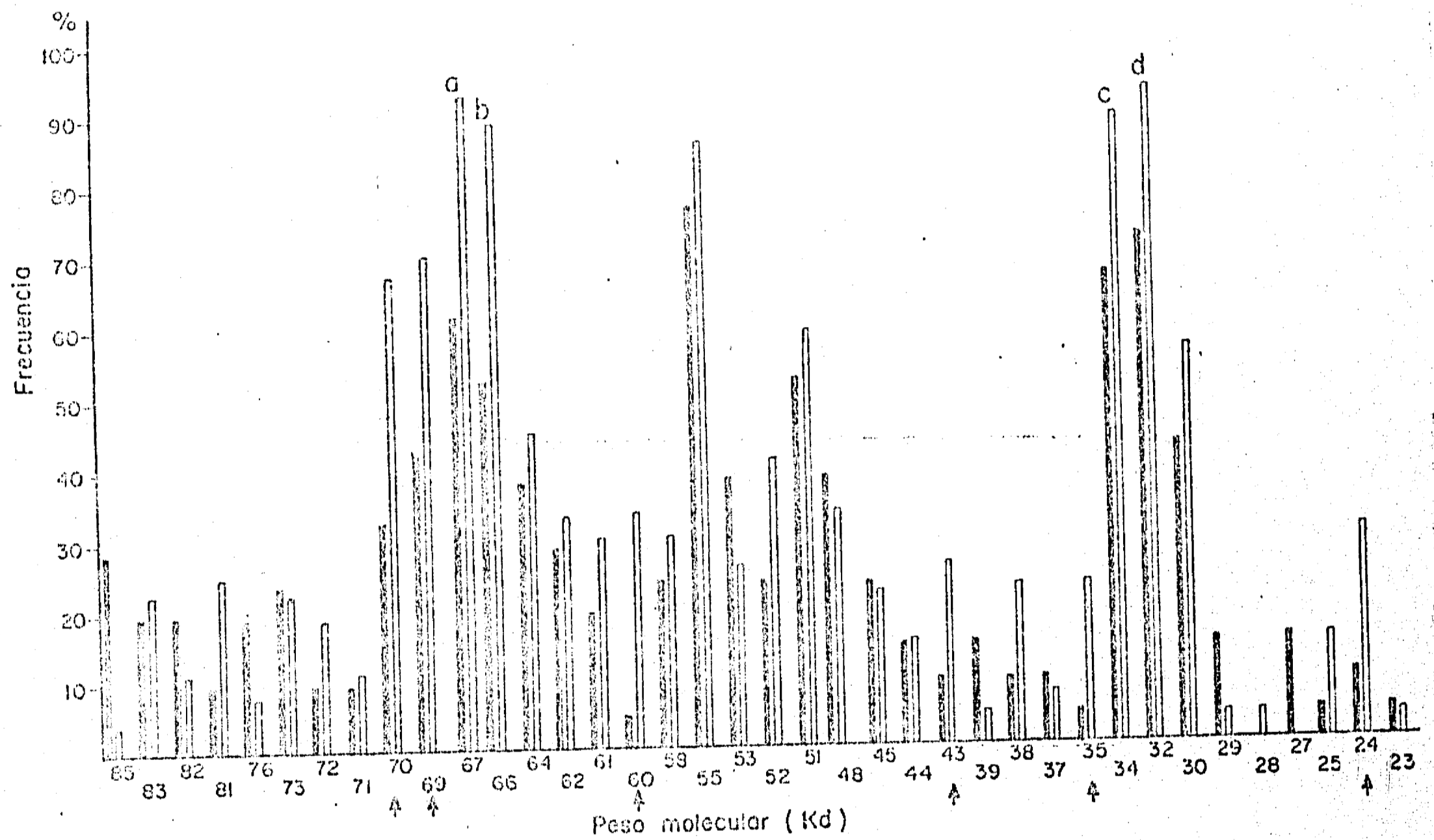


a,b,c,d = Bandas de pegaje inespecífico.

▬ = PPD - n=21

▨ = PPD + n=71

Gráfica 4. Frecuencia en porcentaje, de bandas transferidas de sueros de vacas PPD- y sueros de vacas con lesiones tuberculosas confirmadas por Histopatología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. 1987.



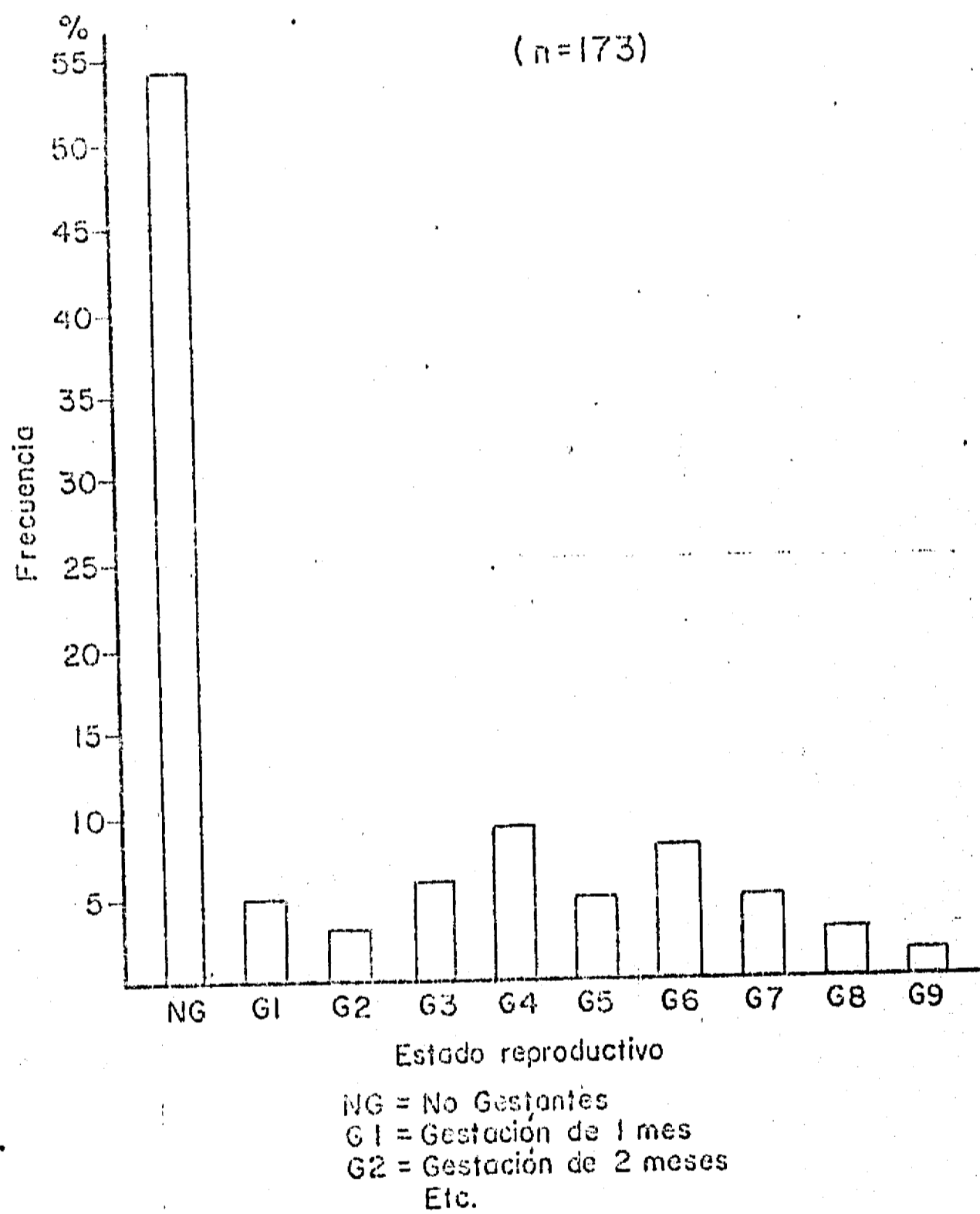
a, b, c, d = Bandas de pegaje inespecífico

▨ = Vacas PPD - n = 21

▩ = Vacas tuberculosas n = 27

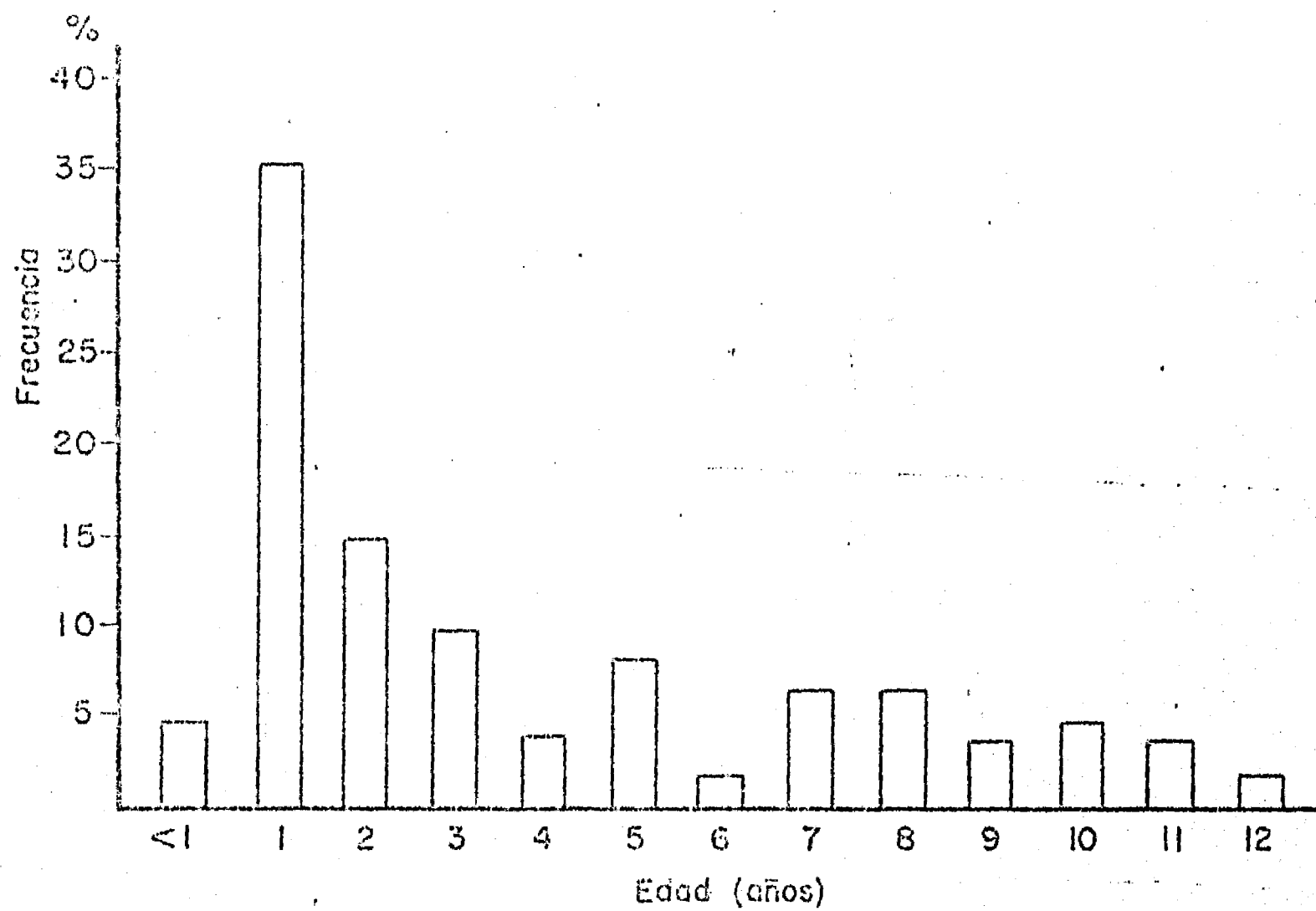


Gráfica 5. Proporción de vacas positivas a la prueba de Tuberculina PPD doble comparativa según su estado reproductivo. Granja experimental de la U.A.Ch. 1987.



Gráfica 6. Edad de los animales a la primera reacción positiva a la prueba de Tuberculina PPD. doble comparativa. Granja experimental de la U.A.Ch., 1987.

(n=64)



(A partir de los dos años de edad, las vacas tenían un mínimo de dos pruebas negativas, previas a la positiva).

LITERATURA CITADA

1. ACHA, N. P. and SZYFRES, B.: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Animals and Man. Pan American Health Organization. Scientific Publicacion No. 354, 1980.
2. ARANDA, P. J.: Epidemiología General. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 1971.
3. AWAD, R. Citado en: Hagan and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animals. Cornell University Press, 1981.
4. BASKAYA, H.; Comparison between slide agglutination and avian tuberculin Test. Veteriner Fakultesi Dergisi Ankara University 30(3)440-448 (1983). Cit. The Veterinary Bulletin 54(8) -- Abs. 4940, 1984.
5. BERLANGA, B.: Historia Natural de la Tuberculosis. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. Vol. XVII, No. 4.
6. BERS, and GARDIN, D.: Protein an nucleic acid blotting and -- immunobiochemical detection, Bio-Techniques Vol. 3, No. 4 - 1985.
7. BOJALIL, L. y BASTARRACHEA, F.: Reliability of the niacin -- test as in epidemiological studies. Am. Rev. Resp. Dis. 84: 272-275 (1961).
8. BOLETIN de la Organización Sanitaria Panamericana, 1975.
9. BOLETIN de la Organización Sanitaria Panamericana, 1977.
10. CHAVEZ, R. P. Efectos de la interpretación del número de -- reacción en pruebas de tuberculina en el ganado bovino para considerar los animales positivos. Rev. Cub. Cienc. Vet. 14(3): 195-200 (1983).
11. CHAVEZ, J. F.: Prueba de fijación de complemento contra Mycobacterium tuberculosis en sueros de bovinos de un hato bajo control de tuberculosis. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1975.
12. DAMSKER, B., BUTTONE, E. J. and SCHENIRSON, D. S.: Human in-- fections with Mycobacterium bovis. Am. Rev. Resp. Dis. 110: 289-292 (1970).

13. DE LISLE, G. W., WELCH, P. J., HAVILL, P. F., JULIAN, A. F. - and POOLE, W. S. H.: Experimental Tuberculosis in red deer - (Cervus elaphus). New Zeal. Vet. Jour. 31:213-216 (1983).
14. DIAGNOSTICO DE LA SALUD ANIMAL EN LAS AMERICAS. Organización Sanitaria Panamericana. Publicación Científica No. 452, 1983.
15. DRESSEN, D. W. and WOOD, A. R.: A human case of *Mycobacterium bovis* infection in Georgia. Am. Rev. Resp. Dis. 101: 289-292 (1970).
16. DURAN, A. G. Incidencia de reactores positivos a la prueba - doble comparativa de tuberculina, en un centro de cría de ganado Holstein-Friesian, en sus diferentes etapas de crianza. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F., 1982.
17. EVANS, T. J. and THOMPSON, H. V. Bovine Tuberculosis in cattle in Great Britain. 1. Eradication of the disease from cattle and the role bagder (*Meles meles*) as a source of *Mycobacterium bovis* for cattle. Animal Regulation Studies 3(3) - 191-216 (1981). Cit. The Veterinary Bulletin Abs. 79, 1982.
18. FRANCIS, J.: First International Seminar on Bovine Tuberculosis for the Americas. Pan American Health Organization, Santiago, Chile, 1970.
19. FRANCIS, J., SEILER, R. J., WILKIE, I. W. O'BOYLE, D., LUMSDEN, M. J. and FROST, A. J.: The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. Vet. Record 102:420-435 (1978).
20. GONZALEZ, J. A., VEITIA, F., REMON, S. y DELGADO L.: Micobacterias aisladas de bovinos que reaccionaron a las pruebas tuberculínicas. Rev. Cub. Cienc. Vet. 14(3):173-176 (1983).
21. GRANGE, J. M.: *Mycobacterial Diseases*, Edward Arnold (Publisher) LTD. London, 1980.
22. GOODERHAM, K.: Protein blotting. Techniques in molecular biology. Croom Helm LTD Publishers, London.
23. HAAGSMA, J., O'REILLY, L. M, DOBBELAER, R. and MURPHY, T. M.: A comparison of the relative potencies of various bovine PPD Tuberculins in naturally infected tuberculouse cattle. Jour. Biol. Stand. 10(4)273-284 (1982).

24. HUITEMA, H. Tuberculosis in animals other than cattle, domesticated and wild: its relation to bovine tuberculosis eradication and its public health significance. First International Seminar on Bovine Tuberculosis for the Americas. Pan American Health Organization, Santiago, Chile, 1970.
25. KANTOR, N. K., ALMARAZ, S., ODEON, D. C., STEFFAN, P. E., AUZA, N. J. y MADRID, O. F.: Las micobacterias no tuberculosas y su importancia relativa en la sensibilización tuberculínica en los bovinos en Argentina. Boletín de la Organización Sanitaria Panamericana No. 86, 420-434 (1979).
26. LEPPER, W. D., PEARSON, C. W. and OUTER RIDGE, P. M.: Assessment of the Bentonite Flocculation Test for detecting tuberculosis in cattle. Aust. Vet. Jour. 49:445-450 (1973)
27. LEPPER, W. D. and PEARSON, C. W.: The Indirect Fluorescent Test for the detection of circulating antibodies in bovine tuberculosis. Aust. Vet. Jour. 51: 256-261, (1975).
28. LEPPER, W. D., CORNER, A. L. and PEARSON, C. W.: Serological responses in experimental bovine tuberculosis. Aust. Vet. Jour. 53:301-335 (1977).
29. LEPPER, W. D., PEARSON, C. W. and CORNER, L. A.: Anergy to tuberculin in beef cattle. Aust. Vet. Jour. 53: 214-216 (1977).
30. LITTLE, W. A., SWAN, C., THOMPSON, H. V. and WHILESMITH, J. W.: Bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in an area of Dorset. I. Tuberculosis in cattle, II The badger population, its ecology and tuberculous status. III. The prevalence of tuberculosis in mammals other than badger and cattle. Jour. of Hyg. 89(2)195-234 (1982).
31. MARTINEZ, J. J. Diagnóstico de la tuberculosis en ganado lechero en el Municipio de Altotonga, Ver., por medio de la prueba doble comparativa de tuberculina bovina y aviar. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Veracruzana, 1983.
32. MOGUEL, M. J., HITOS, O. F. y FLORES, C. R.: Demostración de reacciones falsas positivas a la tuberculina mediante exámenes postmortem y cultivos bacteriológicos. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México, 1982.

33. MORTON, R. F. and HEBEL, J. R. A study guide to epidemiology and biostatistics, University Park Press, Baltimore, 1979.
34. MPOSHI, M., BINEMO-MADI, C. and MUDAKIKWA, B.: Influence of bovine tuberculosis on the health of the human population of North Kivu (Zaire). *Reveu d' Elevage et Medicine Veterinaire des Pays Tropicaus*, 36(1)15-18 (1983). Cit. *The Veterinary Bulletin*, Abs. 555, 1984.
35. OCADIZ, G. J.: Importancia de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas. El caso de la tuberculina. *Memoria de la Reunión Anual de Producción Animal, Oaxaca, Méx., 1984.*
36. OLARTE, J. y VERGARA, L.: Tuberculosis bovina en los niños de la Cd. de México. *Boletín Médico del Hospital Infantil*, 10(4) 673-679 (1953).
37. OUTERIDGE, P. M.: *Veterinary Immunology*, Academic Press, 1985.
38. PREPARACION y Estandarización de Tuberculinas (PPD). *Oficina Sanitaria Panamericana, Publicación Científica No. 17, 1980.*
39. RIVERA, O. M.: La tuberculosis bovina en el Valle de México. *Rev. Salud Pública de México*, Vol. XVII, No. 4, 1976.
40. SALFENDER, T.: Occurrence of *Mycobacterium bovis* in man and animals in Hessen, 1975-1980. Cit. *The Veterinary Bulletin*, Abs. 1483, 1984.
41. SANCHEZ, I. y ROSSEL, L.: Principales fuentes de infección con micobacterias atípicas en ganado bovino. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 14(1)29-33 (1983).
42. STEEL, G. D. y TORRIE, J. H.: *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Mc Graw-Hill. Segunda Edición. México, 1986.
43. SUTHER, D. F., FRANTI, C. E. and PAGE, H. H.: Evaluation of a comparative intradermal tuberculin test in California dairy cattle. *Am. Jour. Vet. Res.* 35(3)379-387 (1974).
44. SZYFRES, B.: The status of animal tuberculosis in the Americas. *First International Seminar on Bovine tuberculosis for the Americas*. Santiago, Chile, 1970.

45. TALAVERA, J. C., DE LA FUENTE, D. G. y BERRUECOS J. M.: Pérdidas económicas por problemas reproductivos. III Edad y causas por las que son desechadas en México las vacas lecheras estabuladas. Tec. Pec. México, 24:21-22 (1973).
46. THOEN, O. C., RICHARD, R. M., PETESBURG, A. T., HARRINGTON, R. and PIETZ, E. D.: Application of a modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting mycobacterial antibodies in the sera of cattle from a herd in which *M. bovis* infection was diagnosed. Proceedings of the 87th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Las Vegas, Nevada, 1983.
47. THORNS, C. J., MORRIS and LITTLE, W. A.: A spectrum of immune responses and pathological conditions between certain animal species to experimental *Mycobacterium bovis* infection. Br. Jour. Exp. Path. 63:562-572, 1982.
48. TOIDA, I., YAMAMOTO, S., TAKUMA, S., SUSUKI, T. and HIRATA, M.: Lack of tuberculin activity of synthetic peptides. Inf. and Imm. 50(3)614-619 (1985).
49. TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J.: Electrophoretic - transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 76(9)4350-4354, (1979).
50. VARDAMAN, H. T. and LARSEN, B. A.: The complement-fixation - test for detecting tuberculosis in cattle. Am. J. Vet. Res. 25(106)690-692, 1964.
51. VERA, A., VOLKOVSKY, G. y REMON, S.: Termorresistencia de las micobacterias atípicas a 60±1 grado centígrado. Rev. Cub. Cienc. Vet. 11: 109-111 (1982).
52. WOODFOR, M. H.: Tuberculosis in wildlife in the Ruwenzori National Park, Uganda. Tropical Animal Health and Production. 14(3)155-160 (1982). Cit. The Veterinary Bulletin, Abs. 6770, 1982.
53. YOUNG, P. G.: Tuberculosis. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1979.
- 24 a. IVANYI, J., MORRIS, J. A. and KEEN, M.: Studies with monoclonal antibodies to Mycobacteria. Monoclonal Antibodies -- Against Bacteria. Academic Press, Vol. 1: 59-90, 1985.