



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN



**Análisis Comparativo del Diagnóstico Presuntivo de Tuberculosis
Bovina, Utilizando las Pruebas de Intradermorreacción
Interferón-Gama y Elisa, Basado en la Inspección
Postmortem.**

T E S I S
Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a
Ciro Estrada Chávez

Asesores: M. C. FERNANDO DIAZ OTERO
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN



37

Análisis Comparativo del Diagnóstico Presuntivo de Tuberculosis
Povisa, Utilizando las Pruebas de Intradermoreactiva
Conferencia Goma y Ullsa, Basado en la Inspección
Postmortem.

T E S I S
Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a
Ciro Entrada Chávez

Asesor: M. C. FERNANDO DIAZ OTERO
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN - A. M.
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón-gamma y ELISA, basado en la inspección posmortem"

que presenta el pasante: Ciro Estrada Chávez
con número de cuenta: 8706262-1 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con :

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de enero de 1995.

PRESIDENTE	M.C. Raúl Mar Cruz	
VOCAL	M.V.Z. José Antonio Licea Vega	
SECRETARIO	M.V.Z. Rafael Pérez González	
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. Victor Quintero Ramírez	
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez	

AGRADECIMIENTOS

A **DOS**: aquella fuerza superior infinitamente a mi fuerza y a todas las que conozco, que sin pedirle nada llena cada espacio con su energía.

A **LOS GRUPOS DE AYUDA**: donde brola el agua que calma la sed, de quien camina sin destino, sin sentido; aquel lugar donde la vegetación florece y me regala su fruto.

A **LA ESCUELA**: por permitirme fomentar mis inquietudes, en compañía de tanta diversidad, donde he logrado encausar mis fuerzas hacia el servicio.

A **LA FAMILIA**: Josefina, mi mamá, Ciro, mi papá, a mis hermanas, Cristina, Francisca, Marcela y Yessica; sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer toda una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constantes, solo quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su incondicional apoyo; su forma de lucha fue mi ideal, su sacrificio mi aliento y su esfuerzo constante, la fuerza de mi voluntad.

A **LOS ASESORES**: al DR. Fernando y al DR. Rafael, por todo el tiempo que emplearon tratando de elaborar un trabajo de calidad, buscando siempre la cordialidad y el punto de entendimiento; esperando contar con su amistad y camaradería dentro y fuera del trabajo.

A **LOS PARTICIPANTES**: a mis compañeros que colaboraron incondicionalmente y de forma versátil Miguel y Roser, a todas aquellas personas que me compartieron sus conocimientos para llevar a cabo este trabajo entre ellos el DR. Maura y su esposa Dra. Juli y el DR. Montañón.

A **LAS MUJERES**: porque son ellas las que me enseñaron desde mis inicios a comprender esa fuerza bajo la cual es posible la creación de nuevos horizontes, por su amor.

A **LOS AMBOS**: Néstor, un gran amigo al que se puede confiar lo más profundo de los sentimientos y que no concibe la traición, será siempre un amigo; Miguel, con quien es posible abrir tantas puertas, caminando juntos abronzados, recordar el camino y planear las andanzas, aun sin momentos de sitio, es una gratificación su existencia, André, porque en el mar de esa sabiduría inherente encuentras la paz que compartes, así como también las tormentas y los amaneceres, repalos involuntarios son las palabras.

A **LOS ENEMIGOS**: no obstante, que coloque todos los ingredientes de una receta en el lugar adecuado, el sazón es algo muy difícil de lograr. Por su sazón que ponen en mi existencia.

A **LOS ANIMALES**: por su nobleza y su carácter, valores enviables y dignos de emular; por el solo hecho de existir.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN:.....	6
IMPORTANCIA ECONÓMICA	6
ZONOSIS.....	7
ASPECTOS ETIOLÓGICOS.....	8
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	8
ASPECTOS PATOLÓGICOS.....	8
ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.....	10
DIAGNÓSTICO:.....	12
PRUEBA DE INTRADERMORREACCIÓN.....	12
PRUEBA DE INTERFERÓN-GAMA.....	15
PRUEBA DE ELISA.....	16
INSPECCIÓN POSTMORTEM.....	17
OTRAS PRUEBAS.....	18
CONTROL.....	18
OBJETIVOS.....	20
HIPÓTESIS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	PÁGINA
FIGURA No. 1: GRAFICA DE IDR.....	25
FIGURA No. 2: GRAFICA DE INF-G.....	26
FIGURA No. 3: GRAFICA DE ELISA.....	28
FIGURA No. 4: GRAFICA DE IP.....	29
FIGURA No. 5: GRAFICA DE IP, DISTRIBUCIÓN DE LEISIONES.....	29
FIGURA No. 6: GRAFICA DE IP, RELACIÓN DEL TAMAÑO Y NÚMERO DE LESIONES.....	31
FIGURA No. 7: GRAFICA DE RESULTADOS, ANIMALES POSITIVOS.....	33
FIGURA No. 8: GRAFICA DE RESULTADOS, ANIMALES NEGATIVOS.....	34
CUADRO No. 1: RESULTADOS ELISA.....	27
CUADRO No. 2: RESULTADOS DE LA IP.....	30
CUADRO No. 3: COMPARACIÓN DE RESULTADOS.....	32
CUADRO No. 4: COMPARACIÓN DE PATRONES DE RESPUESTA.....	33
CUADRO No. 5: COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.	34

RESUMEN

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE TUBERCULOSIS BOVINA, UTILIZANDO LAS PRUEBAS DE INTRADERMORREACCIÓN, INTERFERÓN-GAMA Y ELISA, BASADO EN LA INSPECCIÓN POSTMORTEM.

El control de la tuberculosis bovina (TB) en México, se basa en la identificación de bovinos infectados, utilizando la prueba de intradermorreacción ó tuberculina (IDR), y su consecuente sacrificio; el número de bovinos positivo a la IDR es elevado, lo que crea una posición delicada respecto a los criterios a seguir; la IDR ha mostrado una alta especificidad y una baja sensibilidad, comparada con la de interferón-gama (INF-G), la cual ha mostrado una alta especificidad y una alta sensibilidad. Se han realizado pruebas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar anticuerpos en el suero de vacas infectadas con *Mycobacterium bovis*, utilizando diversos antígenos, entre ellos, el PPD y algunas proteínas aisladas de cultivos de *M. bovis*, en los que se ha demostrado su baja sensibilidad y alta especificidad; sin embargo, datos adicionales evidencian una relación inversa entre la inmunidad celular y humoral presentes en el curso de la enfermedad, lo cual no sustenta el empleo de la prueba para el diagnóstico de rutina, pero sugiere su utilidad para detectar animales anérgicos, con altos títulos de anticuerpos y una pobre respuesta mediada por células. El diagnóstico presuntivo de TB es hecho comúnmente por la inspección postmortem IP, en el rastro, ésta es una medida práctica, debido a las características de las lesiones, y porque el cultivo de muestras para el aislamiento e identificación del *Mycobacterium bovis* (diagnóstico definitivo) es sumamente caro, requiere de mucho tiempo, equipo, personal calificado y resulta ser poco sensible. Con el objetivo de determinar la similitud de los diagnósticos de tuberculosis bovina utilizando las pruebas de IDR, INF-G y ELISA, tomando como base la IP; se trabajó con 31 vacas, de cada una se tomó muestra de sangre (heparinizada), muestra de suero sanguíneo y en el mismo día se les practicó la prueba de IDR doble comparativa, en la tabla del cuello; la evaluación del INF-G después de estimular a los linfocitos *in vitro*, con los PPD'S de *M. avium* y *M. bovis*, se realizó con un producto comercial; los sueros fueron probados, mediante la prueba de ELISA, para detectar anticuerpos específicos, contra antígenos obtenidos de cultivos de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*, de la 12 ava y la 8 ava semana respectivamente; todos los animales fueron sacrificados y se examinaron detalladamente, observando principalmente nódulos linfáticos (NL) retrofaringeos, NL mediastínicos, NL bronquiales y pulmón. De los 31 animales estudiados, 83.87% fueron positivos a la IDR, 77.4% a el INF-G y de estos animales el 67.74% (21), mostraron lesiones sugestivas de la enfermedad. Considerando únicamente a los animales con lesiones, 90.47% (19) fueron IDR positivos y 85.7% (18) INF-G positivos; con respecto a los 10 animales sin lesiones 70% (7) fueron IDR positivos y 60% (6) INF-G positivos; los resultados obtenidos con la prueba de ELISA, no permiten establecer un punto de corte confiable para descartar animales positivos o negativos, debido a que el rango de variación de estos es sumamente pequeño; sin embargo, se obtuvieron niveles muy altos de anticuerpos en un animal que fue anérgico a las otras pruebas y tuvo lesiones diseminadas en diversos NL. Se concluye que existe una gran similitud entre las pruebas de IDR e INF-G, y que el diagnóstico de la TB, mediante estas pruebas conjuntamente, puede disminuir el número de falsos positivos; en cuanto a la ELISA se refiere, ésta podría ser utilizada para identificar animales falsos negativos o sospechosos, probados previamente por la IDR y el INF-G.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, de etiología bacteriana, con una presentación clínica de tipo crónico en la mayoría de los casos, tiene una distribución mundial, con elevada incidencia en explotaciones intensivas con alta densidad de población, tal es el caso de los hatos especializados en la producción de leche (3, 4, 10, 17, 28).

IMPORTANCIA ECONÓMICA

La TB es una enfermedad de alta repercusión económica en las explotaciones bovinas debido a su carácter enzootico, ya que produce la disminución de entre un 10% a 20% en la producción de leche y carne, el sacrificio del 60% del ganado infectado, decomiso de canales afectadas y rompimiento de las líneas genéticas, entre otras consecuencias (3, 4, 7, 8, 31).

La tuberculosis bovina es muy variable en sus efectos en los diferentes hatos y en los diferentes animales afectados; en unos animales puede transcurrir en forma subclínica durante años o por toda la vida, mientras que en otros menos resistentes puede afectar varios órganos, generalizarse y producir un desenlace fatal; el detrimento económico en la producción de tan diversas situaciones patológicas es difícil de evaluar (8).

En un estudio retrospectivo en un hato, para estimar las pérdidas de producción por TB se concluyó lo siguiente: los animales enfermos retardaron su primera lactancia un 10%, disminución de la producción promedio por lactancia en un 9% y una significativa reducción de la duración de las lactancias, que en la tercera fue del 32% (8).

De las pérdidas reportadas por 13 países de América en 1983, el 42.67% era aportado por México; en un estudio realizado en el complejo agropecuario e industrial de Tizayuca, Hidalgo, México, en donde se evaluó el impacto económico de la TB, mediante once variables, se concluyó que la variable más pesada fue la que incluía las pérdidas por períodos de inversión, no recuperados por el pronto desecho de vacas tuberculosas, con el 68.7% del total; este estudio al igual que diversos reportes ponen de manifiesto la necesidad de minimizar e incluso suprimir esta variable (8, 31).

En 1973 se encontró que el 7.23% de los bovinos desechados en la cuenca lechera del D.F., fueron sacrificados por resultar reactores positivos a la tuberculina, considerando que el porcentaje de desechos por enfermedades infecciosas es del 13.1%, el concepto por tuberculosis es muy elevado (11, 24).

Datos oficiales informan que la prevalencia de tuberculosis en México es de 2.1% en ganado lechero y de menos del 0.1% en ganado de carne; el país cuenta con 34 millones de bovinos, de los cuales 5.5 millones son destinados a la producción de leche; se calcula entonces que el total de ganado lechero tuberculoso es aproximadamente de 115,000 animales, considerando las pérdidas económicas por venta a rastro de estos animales, tenemos un costo total de más de 250 millones de nuevos pesos (31).

La producción lechera en México se realiza básicamente por tres sistemas de explotación: la producción lechera especializada o tecnificada, semiestabulación o familiar y ordeña estacional y la tropical o de doble propósito; la lechería especializada se ubica principalmente en el Altiplano Central, Bajío y Altiplano Norte y Noroeste, cuenta con el 8% del hato lechero nacional y contribuye con un 25% de la producción total de leche en México; cuentan con sistemas de producción mecanizados tanto en el ordeño y manejo de la

leche, como en la producción de alimentos. Actualmente México ocupa el primer lugar mundial como comprador de leche en polvo, rebasando en 1991 las 300 mil toneladas, lo cual representa casi la tercera parte de la disponibilidad total (10).

Entre los factores que afectan a la industria lechera, los cuales forman parte de la problemática agropecuaria actual, es de particular importancia mencionar la alta incidencia de enfermedades: en lo que se refiere a sanidad animal, ha faltado continuidad y rigidez en los programas oficiales para prevenir la incidencia de enfermedades como la tuberculosis y la brucelosis. En la mayoría de los casos la medicina veterinaria es curativa y no preventiva, observándose altos costos por este concepto (10).

Existen dos problemas fundamentales en el diagnóstico de TB que representan una carga económica para el productor, que hace más pesada la de por sí incostruable explotación bovina en el país: el primero lo constituye el hecho de dejar un animal falso negativo a la IDR dentro de un hato, el cual constituye un foco de infección latente y representa un grave riesgo para un programa de erradicación, pues provoca un atraso del mismo o una reincidencia de la enfermedad, y por ende eleva los costos; el segundo es la eliminación de animales falsos positivos, que como se sabe, aumentan gradualmente conforme avanza el saneamiento de los hatos (3, 4, 11, 17, 20, 28, 32, 39).

ZOONOSIS

La TB es considerada por organizaciones internacionales de la salud como una zoonosis, su agente etiológico *M. bovis*, tiene como su hospedador principal a los bovinos, pero el hombre es susceptible, pudiendo desarrollar la enfermedad, lo cual representa altos costos en materia de salud pública, gastos terapéuticos y por la disminución de la capacidad laboral, además del sufrimiento de los individuos que la padecen; la TB es una enfermedad que afecta de preferencia a las poblaciones pobres, se registran 7,000 casos nuevos de tuberculosis humana de origen bovino en América Latina por año, las poblaciones vulnerables incluyen a trabajadores rurales y en mataderos (3, 4, 7, 14, 29).

La TB es una zoonosis importante en nuestro país, la vía de transmisión más común al ser humano es por la ingestión de leche o sus derivados no pasteurizados, procedentes de animales enfermos, sin embargo se ha determinado en otros países, que solo entre el 1-2% de vacas tuberculosas, tienen infección de la glándula mamaria; la infección en el humano también se produce por el contacto con animales infectados, por la inhalación o ingestión de los aerosoles, provenientes de ellos, esto es posible durante las prácticas rutinarias de manejo del ganado; debemos tomar que en 1991, el 52% de la producción de leche en México se distribuyó como leche bronca, principalmente por resultar más redituable para el productor la venta directa al consumidor, esta circunstancia en particular aumenta el riesgo de infección (10, 12, 37).

En Inglaterra y en países escandinavos, donde la tuberculosis era endémica, se demostró que del 1 al 6% de las infecciones pulmonares en humanos son producidas por *M. bovis*, este produce infecciones graves en el hombre y en los animales domésticos, excepto en aves; en el hombre causa enfermedad progresiva, a menudo tuberculosis extrapulmonar, con más frecuencia en niños que en adultos, como consecuencia del consumo de leche de vacas infectadas; estas infecciones afectan los nódulos linfáticos de la región de la faringe y de los órganos abdominales en lugar de los del tórax, aunque no son raras las formas pulmonares, en huesos, articulaciones, piel (verruca del anatomatólogo o del prosector) y

meninges. Debido a la reducción de la frecuencia de tuberculosis bovina en muchas partes del mundo, y a la pasteurización de la leche, se ha notado que las formas de tuberculosis asociadas al tipo bovino han disminuido. En 1974 del total de defunciones en México por tuberculosis, el 88.9% correspondió a localización pulmonar, el 7.5% al sistema nervioso central, y el 41.8% del total correspondió a niños menores de 5 años (3, 12, 29, 43).

Son pocos los estudios recientes sobre infección por tuberculosis humana en México, pero los datos existentes permiten suponer que se trata de una enfermedad de alta incidencia y posiblemente en incremento, la Dirección General de Epidemiología estima que actualmente ocurren 100 mil infecciones por tuberculosis y 30 mil casos clínicos cada año, estas cifras posiblemente implican un subregistro importante, por un lado, pues no hay encuestas recientes a nivel nacional y por otro, porque el diagnóstico de infección se establece por IDR, usando 2 unidades de PPD de quizás baja sensibilidad, dado que se ha establecido la necesidad de dosis y técnicas exactas usando 5 unidades de PPD (35).

ASPECTOS ETIOLÓGICOS

El agente etiológico de la tuberculosis bovina es el *Mycobacterium bovis*, por sus factores de virulencia estos bacilos se clasifican como patógenos intracelulares facultativos, que parasitan selectivamente a monocitos, macrófagos y células gigantes, logrando resistir la fagocitosis (capacidad atribuida a sus lípidos y ceras). Los componentes bacterianos que contribuyen a la reacción inflamatoria granulomatosa son: tuberculoproteína, que induce una reacción inmunológica específica contra la micobacteria, la cera D y el factor cuerda (6-6 dimicilil trehalosa) que inducen una inflamación no inmunológica y son necesarios para la reacción granulomatosa máxima, (el factor cuerda solo esta presente en *M. bovis* y en *M. tuberculosis*); estos microorganismos no producen exotoxinas ni endotoxinas y no parecen causar la muerte celular (3, 4, 14, 17, 49, 22, 30, 40, 46).

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

La principal vía de transmisión de la TB, es la aerógena, por la inhalación de aerosoles con dosis elevadas de el microorganismo, el cual tiene una gran resistencia al ambiente y a la acción de desinfectantes, (debido al los lípidos de su pared celular) sobre todo en sitios con una alta humedad y una temperatura baja (4, 11, 12, 17, 21, 46, 47)

Durante la tos y los estornudos una gran cantidad de gotas de diversos tamaños son expelidas, estas provienen principalmente de bronquios y contienen moco, leucocitos y bacilos; en animales con tuberculosis pulmonar abierta, el número de bacilos tuberculosos es proporcional al tamaño de la gota, se ha calculado que las gotas de mayor tamaño pueden contener arriba de 100 o 200 bacilos; el bacilo tuberculoso puede sobrevivir en expectoraciones de gran tamaño por varios meses y en gotas expelidas en la tos de 3 a 18 días; un mayor número de gotas es expelido por aquellos animales vigorosos, en buenas condiciones, y un número menor de gotas por aquellos animales caquéticos; sin embargo los bacilos más virulentos son aquellos que provienen del esputo de animales caquéticos, debido a su mayor resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador, que no pudieron atenuar al bacilo (12, 21).

ASPECTOS PATOLÓGICOS

Los bacilos tuberculosos fueron identificados hace más de 100 años; sin embargo,

información definitiva sobre la patogénesis de *Mycobacterium bovis* no está bien definida. La inhalación de aerosoles cargados con el microorganismo provenientes del pulmón y asociados con los NL, comienza en el aparato mucociliar; el epitelio ciliado recubierto de moco en los pasajes respiratorios, provee de una defensa con la que tropieza la infección; los microorganismos están contenidos en pequeñas gotas de agua, que al tropezar con la capa mucociliar pueden ser acarreados hacia los bronquiolos terminales y de aquí hacia los espacios alveolares, es en estos pasajes en donde los bacilos pueden ser ingeridos por fagocitos, estas células entran en la circulación linfática, llegando de esta forma a los nódulos linfáticos bronquiales y a otros sitios del parénquima pulmonar. Después de la ingestión del bacilo los macrófagos tratan de matarlo; sin embargo los bacilos tuberculosos virulentos poseen la habilidad de resistir la destrucción, particularmente si son fagocitados por macrófagos, donde proliferan y se liberan cuando la célula hospedadora muere y se lisa (4, 14, 17, 22, 46, 47)

Existe un flujo de macrófagos hacia el foco de infección, algunos macrófagos que abandonan la lesión por vasos linfáticos, contienen bacilos tuberculosos que llevan a los NL regionales, formando un tubérculo característico de la enfermedad denominada complejo primario, a partir del cual se da una diseminación posprimaria (hematógena), debido a su erosión en vasos sanguíneos, hacia parénquima pulmonar, NL mesentéricos, retrofaringeos y otros, posteriormente a partir de los NL afectados se da una diseminación secundaria a hígado y/o riñones y es posible que de estos órganos surja una reinfección ya sea endógena o exógena hasta la tuberculosis miliar (4, 14, 17, 22, 46)

El centro del tubérculo se compone de macrófagos muertos, bacterias destruidas y micobacterias extracelulares vivas, rodeadas de células epiteloideas y células gigantes. Este centro de necrosis caseosa característico, se va ensanchando según se activan los mecanismos de coagulación y se trombosan los capilares, arteriolas, y vénulas, posteriormente tiene lugar una calcificación distrófica, alrededor de este centro se localiza una delgada capa de linfocitos (corona linfocitaria), el tubérculo está encapsulado por tejido conectivo fibroso, a su vez rodeado de tejido de granulación; las lesiones causadas por el *Mycobacterium bovis*, tienen solo unos cuantos microorganismos que pueden ser encontrados por el examen microscópico (4, 14, 17, 22, 46, 47)

Cuando el proceso de cicatrización en las lesiones fracasa se desarrolla una bronconeumonía progresiva; existen dos diferentes rutas mediante las cuales es posible que se produzcan nuevos centros de infección: en primer lugar, cuando la lesión primaria alcanza un cierto tamaño, y especialmente cuando se ablanda o licúa, los bacilos son arrojados dentro de los bronquios y son acarreados a otras porciones sanas del pulmón durante los accesos de tos; de esta manera los bacilos ya sea, en la membrana mucosa de los bronquios con los que tengan contacto directo, o al ser aspirados dentro de los alvéolos en lugares remotos de la lesión primaria, pueden producir nuevos centros de enfermedad, cada uno de estos centros puede evolucionar de la misma forma que el primero; la segunda ruta mediante la cual los bacilos pueden ser transportados a partir del foco primario de infección es a través de los vasos linfáticos; durante el curso de la enfermedad, los bacilos son transportados hacia los NL bronquiales y mediastínicos y cuando esto ocurre se desarrollan tubérculos a lo largo del curso de los vasos linfáticos y en los NL (12).

Los NL son más comúnmente infectados que otros tejidos porque el flujo de linfa en un animal eventualmente pasa por todos los nódulos, que es donde capta a los bacilos el

organismo. La presencia de macrófagos y su aumento en un pasadizo impenetrable entre las células reticulares fibrosas de los NL, provee de un ambiente para el crecimiento micobacterial y el desarrollo de las lesiones granulomatosas en el nódulo. Ocasionalmente algunos micobacterias fagocitadas permanecen en el pulmón y en los NL, entonces ambos se ven afectados (complejo primario). Las lesiones primarias frecuentemente se llegan a localizar en un nódulo o en varios y pueden ser grandes y firmes. El tejido conectivo fibroso se desarrolla dinámicamente en la formación del granuloma, probablemente contribuye a la localización de las lesiones; la formación de granulomas es un intento del hospedador para localizar el proceso de enfermedad; pocas lesiones pueden aparentemente remitir y llegar a ser encapsuladas por la proliferación de tejido conectivo; cada una de las lesiones puede contener bacilos viables (12, 47).

En animales con enfermedad avanzada el tipo de lesiones va a depender de su grado de resistencia, particularmente a el tiempo en que los bacilos logren alcanzar otros sitios y por supuesto, a su grado de virulencia; la confluencia y licuefacción de los focos caseosos de todos tamaños y edades, producen la formación de cavidades, que son cubiertas por tejido conectivo denso, tejido de granulación y se observan vasos sanguíneos obliterados, de los cuales emana sangre; este tipo de lesiones en el pulmón rara vez se rompen y descargan su contenido de material contaminante hacia la cavidad torácica. Las lesiones en la pleura consisten primero en pequeñas áreas rosadas de consistencia blanda que llegan a transformarse en lesiones características de nódulos tuberculosos fibrosos. El pericardio, pleura, o el peritoneo, pueden ser infectados por ruptura de lesiones en el pulmón o de alguna otra región, y por difusión hematogena o linfática; este estado de infección sucede raramente en el bovino, considerando que la vía de diseminación más importante en esta especie es la vía linfática (12, 47).

La patogenicidad del bacilo tuberculoso es un fenómeno multifactorial y requiere la participación y efectos aditivos de varios componentes; la estructura y funciones biológicas de la pared celular de las micobacterias patógenas, han sido investigadas y sin embargo, el entendimiento de las funciones de cada uno de los componentes en la patogénesis, no esta claro (47).

ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

El termino de hipersensibilidad describe la interacción del sistema inmuno-competente con un antígeno que provoca daño para el organismo, o sea, una respuesta inmunitaria inadecuada que puede producir lesión tisular; cuando un individuo se a sensibilizado inmunológicamente (respuesta primaria a un antígeno), el contacto posterior con el mismo produce un recuerdo secundario de la respuesta inmune (memoria), sin embargo, la reacción puede ser excesiva y provoca una lesión tisular; la hipersensibilidad de tipo IV se debe a una interacción entre el antígeno y los linfocitos T sensibilizados; así tenemos que esta reacción esta basada en una respuesta inmune debida a células de memoria del sistema inmune (40, 44, 49).

La inmunidad celular es un fenómeno mediado por subpoblaciones de linfocitos T, que están distribuidos en los órganos linfoides secundarios como son: nódulos linfáticos, bazo, tonsilas, placas de Peyer, etc. En estos órganos es donde se lleva la captación del antígeno y el desarrollo de la respuesta inmune. Es importante señalar que la mayoría de los linfocitos circulantes son tipo T (40, 49, 44).

Las subpoblaciones de linfocitos T se distinguen por diferencias fenotípicas a nivel de moléculas expresadas en su membrana citoplasmática (antígenos de superficie). De esta forma los linfocitos T se subdividen en dos principales subpoblaciones: los linfocitos T4, que expresan en su superficie una glicoproteína de 62 KD (kilodaltons), dentro de este grupo tenemos a los llamados linfocitos T cooperadores; la otra subpoblación está formada por los linfocitos que presentan en su membrana celular una glicoproteína de 76 KD, por lo que se denominan linfocitos T8, dentro de estos tenemos a los denominados linfocitos T citotóxicos y a los linfocitos T supresores (40, 44).

En la respuesta inmune mediada por células, que es la importante contra las infecciones intracelulares, como la producida por *Mycobacterium bovis*, se generan dos tipos de manifestaciones efectoras: la producción de linfocinas y la producción de linfocitos T citotóxicos (40, 44, 51).

Los linfocitos T cooperadores al ser estimulados por la presentación del antígeno y por la IL-1 (interleucina 1), se activan y proliferan dando lugar a linfocitos T productores de linfocinas y a células de memoria. Son precisamente estos factores los responsables de la reacción inflamatoria observada en el sitio de inoculación de la tuberculosis. Las linfocinas son factores solubles que tienen varias funciones, entre las que se encuentran activar macrófagos y atraerlos hacia el lugar del estímulo antigénico y amplificar la respuesta local. Todavía no se conoce de modo preciso la bioquímica de las linfocinas (citocinas), las cuales se suelen definir por sus actividades biológicas y es probable que muchas de ellas tengan más de un efecto. Ha sido demostrado que los macrófagos tratados con INF-G (linfocina) mejoran su capacidad para inhibir el crecimiento de bacilos tuberculosos vía la producción de nitrógeno reactivo interviniente (40, 44, 47).

Como se observa, la inducción de linfocitos T productores de linfocinas es un fenómeno específico, sin embargo el efecto de éstas linfocinas, es inespecífico; por otro lado los linfocitos T cooperadores, estimulados por la presentación del antígeno secretan también la IL-2 (interleucina 2), que coadyuva a la activación y proliferación de linfocitos T citotóxicos que actúan sobre determinantes antigénicos en combinación con antígenos de histocompatibilidad clase I, en la membrana de las células blanco, estas células blanco podrían ser por ejemplo, macrófagos infectados por *Mycobacterium*, lo cual puede producir daño tisular (40, 44).

Aunque inicialmente la micobacteria se encuentra con componentes humorales normales y granulocitos (neutrófilos), los mecanismos de activación de macrófagos son consideradas como los más importantes en la protección del hospedador contra el *Mycobacterium bovis*; los macrófagos son comprometidos en el procesamiento de antígenos micobacteriales y su presentación a los linfocitos T, por lo cual son considerados como la llave para la unión y el reconocimiento en la respuesta inmune contra las micobacterias (47).

La activación de los macrófagos puede matar o inhibir el crecimiento de un pequeño número de microorganismos invasores, sin embargo, comúnmente la micobacteria sobrevive a estos mecanismos inmunológicos alcanzando un número crítico y un macrófago individualmente no es capaz de aumentar su capacidad de destrucción y esto hace probable la diseminación de la infección (47).

La tuberculosis es la infección prototipo para un número diferente de infecciones causadas por bacterias y hongos intracelulares, en los que la inmunidad mediada por células es al único medio de resistencia inmunológica (49, 30).

Se menciona que la inmunidad humoral juega un papel escaso o nulo en la inmunología de la tuberculosis, que los anticuerpos producidos durante la infección no son bactericidas *in vivo*, aun en presencia de complemento y, debido a que opsonizan al bacilo tuberculoso y facilitan la fagocitosis, sólo logran apoyar la entrada del bacilo a la célula, donde pueden multiplicarse; estudios realizados en humanos y recientemente en bovinos establecen una evidencia circunstancial de una reacción inversa entre respuestas de inmunidad humoral y celular al *M. bovis*; es prioritario determinar el papel de la inmunidad humoral en el curso de la enfermedad así como su posible empleo para el diagnóstico (3, 39).

DIAGNÓSTICO

PRUEBA IDR (intradermorreacción)

En la respuesta inmune a las infecciones por *Mycobacterium* predomina la respuesta celular; es por ello que las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis, están basadas en la medición de la respuesta inmune celular (20, 51)

Los seguidores de Roberto Kochs, quien fué el primero en utilizar la prueba de tuberculina en el año de 1890, fueron los primeros en reconocer y demostrar el uso de la tuberculinización como método potencial de diagnóstico; en 1892 Pearson, demostró que la prueba de tuberculina es capaz de identificar el ganado tuberculoso clínicamente inaparente y en 1899 M'Fadyean estandarizó este método para el diagnóstico de TB (42, 51).

Las campañas de control y erradicación de tuberculosis en el ganado bovino, implementadas en países que han logrado disminuir el índice de TB, consisten en realizar periódicamente la tuberculinización y desechar a los animales reactivos positivos); este método presenta un cierto número de inconvenientes que son a la vez de orden científico, técnico y económico (20, 31).

Como todos los métodos biológicos, las reacciones a la tuberculina tienen fallos, estos pueden ser de dos tipos: (20)

- Por defecto o de primer orden: animales tuberculosos que son negativos a la intradermorreacción y por tanto no descubiertos; estos casos son denominados de anergia, la cual presenta como mínimo dos variantes:

- a). La anergia pre-alérgica, que corresponde a un estado de infección reciente, durante la cual el organismo no ha tenido tiempo de sensibilizarse; se estima que es de tres semanas a un mes.

- b). La anergia post-alérgica, o de caquexia, en el curso de la cual el estado de infección evoluciona hacia su término.

- Por exceso o de segundo orden: animales que presentan reacción positiva y una vez sacrificados se comprueba que no tienen lesiones o no son tuberculosos:

- En etapas tempranas de la enfermedad y con lesiones microscópicas

- Con lesiones que pasan desapercibidas

- Reacciones inespecíficas o de sensibilidad cruzada (2-20% varía según la zona)

- Reacciones debidas a mecanismos anespecíficos.

Son diversos los elementos de variabilidad anespecíficos de la reacción, entre ellos están, el grosor cutáneo, raza, edad, sexo, modificaciones hormonales, factores ligados al medio, como el terreno, la proximidad a zonas boscosas y la altitud, las infecciones

concurrentes (viriosis), entre otros (8, 20).

Existen también errores inevitables cuando se aplica la prueba de tuberculina, esto se asocia con el operador, con la dosis inyectada y con el tiempo transcurrido hasta el momento de realizar la lectura (8, 20).

Además de las reacciones inespecíficas ya mencionadas, existe la posibilidad de reacciones falsas positivas debidas a fallas en el procesamiento del PPD, como por ejemplo, la concentración final de proteínas y factores intrínsecos de cada animal que determinan el tamaño de la reacción inflamatoria; el PPD no es una entidad química específica sino que consiste en varias fracciones proteicas con distintos pesos moleculares y diferentes características biológicas como sensibilidad y especificidad (11, 20)

Los resultados reportados en la literatura, obtenidos de la evaluación de la prueba de IDR, muestran en el caso de la prueba simple caudal una sensibilidad del 72 al 81% y una especificidad del 78 al 96%; esta prueba simple caudal, es la más apropiada cuando se requiere la más alta especificidad con una sola inyección de PPD; en el caso de la prueba simple cervical se recomienda su uso en los casos que se requiera la máxima sensibilidad posible; la prueba cervical doble comparativa utilizando PPD aviar y PPD mamífero, muestra en algunos estudios tener una mayor eficiencia que una simple inyección de PPD mamífero en el cuello, pero en otros aparentemente tiene una baja sensibilidad y especificidad, pero es indiscutible que permite diferenciar la infección por Mycobacterium bovis de las causadas por las bacterias del complejo Mycobacterium avium o por micobacterias atípicas (13, 16, 19, 20, 36, 43, 51).

Es importante recalcar que existen en la naturaleza numerosas especies del género Mycobacterium, que no han sido plenamente clasificadas, llamadas micobacterias atípicas, que aparentemente tienen una amplia diseminación en el medio ambiente; algunas de éstas pueden sensibilizar a los animales respecto a la tuberculina de mamífero, generando reacciones no específicas a la prueba o falsas positivas, cuando se usa la prueba simple. Estos grupos atípicos de micobacterias pueden producir lesiones macroscópicas visibles en la necropsia; no es raro que más de una especie de micobacteria cause la enfermedad en un hato al mismo tiempo (1, 3, 4, 11, 16, 20, 28, 41).

El M. avium esta estrechamente relacionado con el M. paratuberculosis, antigénicamente estos microorganismos son indistinguibles; animales infectados con cualquiera de estas especies de micobacteria e incluso vacunados con vacuna viva de M. paratuberculosis son sensibles a la tuberculina de mamífero y pueden ser reactivos falsos positivos (2, 3, 4, 20, 36).

Se ha comprobado que la sensibilidad inducida por éstas es mayor, cuando se usa tuberculina de tipo PPD aviar, que se obtiene a partir de cultivos de M. avium y se emplea dentro de la campaña de control y erradicación de TB, para pruebas dobles comparativas en la tabla del cuello, cuando la prueba de rutina ha generado dudas respecto a los resultados (3, 4, 11, 16, 17, 20).

En Kenia, así como en otros países, se ha registrado una alta sensibilidad a la tuberculina por exposición de los bovinos a personal tuberculoso infectado con Mycobacterium tuberculosis encargado de su cuidado (4, 20).

Bovinos sensibilizados a otros géneros bacterianos, como por ejemplo Corynebacterium y Nocardia, que están estrechamente relacionados con el género Mycobacterium, ya que poseen similitudes tanto químicas como serológicas entre los principales

antígenos de su pared celular, tienen reacciones falsas positivas a la IDR (1, 3, 4, 5).

Algunos animales que dan reacciones positivas a la tuberculina, no presentan lesiones en la inspección postmortem, a los cuales se les denominan casos sin lesiones visibles, o con lesión no macroscópicas; las hipótesis proponen que estos animales están en estados iniciales de la enfermedad, que tienen lesiones pequeñas en partes del cuerpo que generalmente no se examinan en el trabajo sistemático de inspección de la carne o que han estado en contacto con *M. avium*, micobacterias atípicas u otras bacterias ácidosresistentes; se presupone que al inicio de la infección cuando aún no se desarrollan lesiones macroscópicas los animales son altamente sensibles a la prueba de tuberculina, también se ha visto que focos del tamaño de un grano de arroz son capaces de sensibilizar al animal al PPD (3, 9, 24, 31).

Es posible que cuando las lesiones tuberculosas son muy amplias, los tejidos están tan saturados con la tuberculoproteína que resultan insensibles a la tuberculina, constituyendo así reacciones falsas negativas, en este caso por anergia asociada a tuberculosis generalizada; la razón de la anergia en animales tuberculosos que no reaccionan a la prueba de IDR no se conoce con certeza, se atribuye en parte a la posible inmunosupresión relacionada con las citocinas u otros factores solubles provenientes de subpoblaciones de linfocitos (3, 4, 13, 20, 32, 39, 47).

El número de animales tuberculosos no diagnóstico o anérgico es muy variable, entre los diversos autores que lo citan encontramos un rango del 11% al 20%; se sabe que un número considerable de animales en etapas tempranas de la enfermedad no responden a la prueba de IDR, lo cual puede ser causa de recaídas en el índice de reactores positivos en etapas finales de una campaña; el problema de los reactores falsos negativos puede ser minimizado por la eliminación de todos los animales que reaccionen a la prueba de tuberculina en la prueba inicial; este criterio es comunmente implementado en países desarrollados, donde los programas de control y erradicación de TB, incluyen la indemnización a los ganaderos (20, 26, 27, 47).

La acción de la gestación avanzada y del parto, ligada posiblemente a influencias hormonales, provoca una depresión intensa de la reactividad de la IDR, recuperándose esta por completo poco a poco, 4 a 8 semanas después del parto, pero vacas que han parido en el transcurso de las seis semanas anteriores a la aplicación de la IDR así como los animales sometidos a la prueba entre una y diez semanas antes, pueden tener reacciones falsas negativas; la prueba de Stormont que consiste en repetir la inyección de PPD a los 7 días, es capaz de confirmar los casos de tuberculosis en vacas recién paridas, con el gran inconveniente del doble manejo de los animales (4, 20, 36).

Es posible que existan casos de anergia relacionados con el stress debido al pico de lactancia, desnutrición, tratamientos con prostaglandinas o corticoesteroides (8).

Es trascendental señalar el aislamiento de *M. bovis* de moco nasal de animales IDR negativos, aparentemente sanos, pues implican un éxito parcial para cualquier programa de control o erradicación de la TB. Además se sugiere la sobrevivencia del microorganismo en la mucosa de cavidad nasal, sin tratarse de una infección establecida, ya que no presentan lesiones en la mucosa nasal y no se encuentran lesiones sugestivas de tuberculosis en el pulmón o nódulos linfáticos (26).

No existe hasta el momento una prueba lo suficientemente sensible para identificar animales en etapas tempranas o tardías de la enfermedad, lo cual suele ser causa común de

recrudescimiento en rebaños clasificados como exentos del padecimiento (3, 4, 26, 27).

La exploración y aislamiento de animales durante 3 días, indispensable para la aplicación de la IDR, representa un manejo difícil sobre todo en explotaciones de tipo extensivo, por lo cual es necesaria una prueba que no exija tal manejo (4).

PRUEBA DE INF-G (interferón-gama)

Los interferones modulan la actividad de casi todos los componentes del sistema inmunitario, reforzando la capacidad del organismo de sofocar los ataques de la mayoría de los agentes causantes de enfermedad: parásitos, bacterias y virus; los interferones pueden promover o inhibir la diferenciación de diversas células y pueden inhibir la división celular, lo que explicaría en parte que atentan contra la proliferación de los tumores (18).

Los linfocitos T supresores (CD8), estimulados estos por el INF-G, inhiben la reproducción de anticuerpos por los linfocitos B; los interferones también retrasan la síntesis de ciertas citocinas en otras células (18).

Un método alternativo para el diagnóstico de TB, se relaciona con la identificación y cuantificación del INF-G en plasma, obtenido a partir de sangre completa estimulada con PPD, mediante una prueba de ELISA: en investigaciones recientes se describe el desarrollo de la prueba de INF-G como un método *in vitro* simple y rápido para el diagnóstico de TB; esta prueba ha sido evaluada experimentalmente y en campo con resultados bastante alentadores (42, 51).

En un experimento realizado por Wood, P.R. y colaboradores la prueba de INF-G, demostró ser más sensible y específica para el diagnóstico de la TB, en comparación con la prueba de IDR y la prueba de ELISA; en su estudio se utilizaron las tres pruebas en los mismos animales de un hato, de los cuales, algunos fueron revisados a la IP y se les tomó muestra de NL, hígado, bazo y/o pulmón, con el fin de establecer un diagnóstico definitivo por medio del cultivo y aislamiento de *M. bovis*: además menciona que cuando se suman los resultados de la prueba de IDR y la prueba de INF-G se obtiene una alta especificidad y la más alta sensibilidad (52).

No obstante la prueba de intradermorreacción (IDR) constituye un elemento fundamental de una campaña de control y erradicación de la TB, ya que ha demostrado ser una excelente prueba de campo, se ha podido aislar al *Mycobacterium bovis* de moco nasal proveniente de animales aparentemente sanos, cuyo resultado a la IDR fue negativo, estableciendo que estos animales no eran anérgicos, como en los casos de enfermedad avanzada, inclusive algunos de estos animales no presentaron lesiones visibles a la necropsia, lo cual sugiere una etapa temprana de la enfermedad; estos animales fueron detectados como positivos por la prueba de INF-G (26, 27).

La prueba de IDR con PPD bovino es un potente estimulador de la producción de anticuerpos en animales infectados con *M. bovis*, por otro lado, la prueba de INF-G no compromete el estado inmunológico del animal, así la repetición inmediata de la prueba en animales sospechosos es posible, y los resultados son disponibles de 24 a 48 horas después; además no requiere de un excesivo manejo de los animales y la muestra colectada puede ser útil para el diagnóstico paralelo de otras enfermedades (32, 36, 51, 52).

PRUEBA DE ELISA

En la infección tuberculosa se producen anticuerpos que pueden detectarse

mediante diversas pruebas serológicas, incluyendo la precipitación, la de fijación del complemento, la de hemoaglutinación y la de ELISA; los animales tuberculosos suelen reaccionar a ellas aunque tiene por lo general bajos títulos de anticuerpos, pero un gran número de animales sanos también reaccionan (3, 16, 23, 30, 38)

Se han determinado dos problemas fundamentales en la elaboración de extractos micobacteriales para ser usados como antígenos en diversas pruebas inmunodiagnósticas: el primero es el efecto de proteasas endógenas sobre los componentes micobacteriales, durante su crecimiento y subsecuente aislamiento; el segundo es en relación al efecto de autoclaveo (calentamiento) sobre la solubilidad de los componentes y la antigenicidad del biológico (15).

Se ha mencionado la importancia de aquellas reacciones cruzadas a epitopes comunes entre micobacterias y otro tipo de microorganismos, en el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones micobacteriales, la naturaleza de dichas reacciones se define con la identificación de los epitopes, por medio de anticuerpos monoclonales; es por ello necesario lograr el aislamiento de epitopes comunes entre micobacterias de distintas especies y otro tipo de microorganismos, tales como: *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Haemophilus*, *Taylorella*, *Moraxella*, *Fasciola*, *Trichinella*, *Hypoderma*, *Penicillium*, *Brucella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Vibrio*, y *Yersinia* (1, 48).

Thoen usó PPD como antígeno en una prueba ELISA, con sueros de vacas reactoras a la prueba de IDR y obtuvo reacciones intensas; Ritacco cita una sensibilidad del 73.6% y una especificidad del 94.1% para la prueba de ELISA en el diagnóstico de TB, mencionando que esta prueba diferencia los animales infectados con *Mycobacterium paratuberculosis*, por lo que la considera una prueba capaz de identificar hatos con TB (32, 38).

En un estudio realizado por Wood, P.R. y colaboradores se menciona que la prueba de ELISA, usando como antígeno una proteína denominada MPB 70, distinta en su fundamento a la IDR y a INF-G, da como resultado una alta especificidad y una baja sensibilidad (52).

Los resultados de una ELISA, usando un antígeno fosfatado de *M. bovis*, para detectar la respuesta inmunológica de tipo humoral, en vacas tuberculosas, infectadas experimentalmente, sugirieron un valor inmunodiagnóstico potencial de este antígeno (16).

En otro estudio realizado por Ritacco y colaboradores, se menciona que no obstante que la prueba de ELISA fue menos sensible y específica que la prueba de INF-G, es posible emplearla en animales con lesiones diseminadas debido a que estos muestran un elevado nivel de anticuerpos y una baja respuesta inmune mediada por células; algo similar fue lo señalado por Plackett y colaboradores, ellos mencionan que la prueba de ELISA no es una alternativa similar a la prueba de tuberculina, pero sí para detectar vacas anérgicas; Auer realizó una prueba de ELISA, usando *M. bovis* crudo como antígeno, encontrando que esta careció tanto de especificidad como de sensibilidad requerida para la identificación confiable de vacas tuberculosas, menciona que la cantidad de anticuerpo reaccionando con el antígeno crudo es baja en muchos animales y la cantidad que reacciona con epitopes específicos de *M. bovis* es mucho más baja; concluyendo que los valores de la prueba de ELISA dependen de su uso conjuntamente con la prueba IDR ó INF-G, para detectar una proporción de vacas anérgicas infectadas (32, 39).

INSPECCIÓN POSTMORTEM (IP)

El diagnóstico presuntivo de TB es hecho comúnmente por la IP, esto se justifica como una medida práctica, debido a la apariencia característica de las lesiones, y por que el cultivo de muestras que permita el aislamiento y la identificación de micobacterias patógenas (diagnóstico definitivo) es sumamente caro, requiere de mucho tiempo, equipo y personal calificado, además de que resulta ser poco sensible, posiblemente porque las lesiones crónicas tienen pocos microorganismos viables; es por todo lo anterior que no se utiliza como procedimiento de rutina; la IP no da una medida confiable de sensibilidad a las diferentes pruebas, pero no niega su aproximación, y puede permitir a los métodos de análisis, una comparación (9,11).

Esta ampliamente documentado que las lesiones tuberculosas se presentan en NL asociados con el tracto respiratorio en aproximadamente 90% de reactores positivos con infección confirmada, y que solo del 1% al 2% de estos animales tiene lesiones visibles en pulmón por lo general muy pequeñas (menores de 1cm) y frecuentemente únicas; sin embargo un estudio histopatológico muy extenso hace evidentes las lesiones en este órgano, hasta en un 70% de estos casos; las vacas tuberculosas con lesiones solo en NL respiratorios (lesiones cerradas) no se consideran capaces de excretar bacilos, pero pueden ser consideradas como excretoras potenciales, debido a que el desarrollo de lesiones en el pulmón y la consecuente excreción puede ocurrir rápidamente (21).

En las primeras etapas de control de hatos con elevados índices de infección, y en los que no se realizó anteriormente ningún saneamiento, cerca del 90% de los bovinos reactores puede presentar lesiones postmortem; a medida que la prevalencia disminuye, también es menor el porcentaje de reactores con lesiones en la IP; en áreas de prevalencia sumamente baja, aunque la prueba posea alta especificidad, el valor predictivo de la misma será también muy bajo y se hallará que la mayor parte, o todos los animales reactores sacrificados no presentan lesiones ni aislamiento de *M. bovis*; es por ello que en situaciones de muy baja prevalencia, las pruebas tuberculínicas masivas, deberán ser gradualmente remplazadas por la inspección veterinaria en rastro y seguimiento al hato en donde se compruebe tuberculosis (11, 24, 31, 36, 37).

En un estudio realizado por Ritacco, lesiones localizadas (confinadas a NL), que se encontraron en la IP de animales previamente probados por IDR, se asociaron a un alto nivel de INF-G y niveles bajos de anticuerpos específicos, y viceversa, niveles bajos de INF-G junto con niveles altos de anticuerpos se asociaron a una etapa avanzada de enfermedad (39).

En la IPse deben considerar todas aquellas etiologías que tienden a producir lesiones macroscópicas de tipo granulomatoso y que no pueden diferenciarse las lesiones producidas por *Mycobacterium*; entre las más importantes tenemos a la actinomicosis, actinobacilosis, aspergilosis, carcinomatosis, coccidioidomicosis, corinebacteriosis, migraciones larvianas y linfosarcoma (24).

Las infecciones causadas por *Mycobacterium avium* pueden producir lesiones locales en NL mesenterios, meninges, útero y ubres, y se observan algunos casos de tuberculosis pulmonar abierta producida por *M. avium* y puede ocurrir tuberculosis generalizada en cierto número de casos; la mayor parte de los casos de tuberculosis en animales causados por *M. tuberculosis* de origen humano son transitorios y con lesiones mínimas en NL o sin estas; los reactores a esta especie de micobacteria y las lesiones

observadas en la necropsia, producidas por la misma, son más frecuentes en el grupo de animales jóvenes de un hato (3, 4, 20, 24)

OTRAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Debido a los problemas que presentan las pruebas actualmente utilizadas en el diagnóstico de la TB, impera la necesidad de investigar por todos los medios posibles el fenómeno desmembrando sus variables, y para establecer relaciones que pudieran tener un valor diagnóstico, que aunado a medidas como la cuarentena y desinfección permitan alcanzar el objetivo de la erradicación, elevando así la producción, mejorando la calidad sanitaria de los productos de origen animal y eliminando una fuente de infección para el ser humano (4, 11).

El desarrollo tecnológico aporta nuevas posibilidades para el diagnóstico de este padecimiento, por lo cual se deberá de apoyar la creación de pruebas diagnósticas mejoradas, que sean más sensibles y específicas que las pruebas en uso; pruebas que puedan realizarse en conjunto con otras y que no requieran repetido manejo, ya que el uso de pruebas en serie aumenta la especificidad final del diagnóstico; por lo tanto, contar con una batería de pruebas diagnósticas, empleadas como pruebas complementarias a la prueba tuberculínica, en vigilancia epidemiológica o para confirmación diagnóstica, utilizadas con buen criterio, puede resultar beneficioso para los programas de control (37).

Las pruebas propuestas actualmente son: ELISA, interferón-gama, transformación blastoide, inhibición de la migración de macrófagos, técnicas inmunohistoquímicas, glutaraldehído, técnicas de tinción como son Ziehl Neelsen, Kinyoun y aureamina, cultivo de micobacterias e inoculación de cobayos, identificación del ADN bacteriano o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), determinación de patrones de ADN con enzimas de restricción y cromatografía de líquidos de alta presión (37).

CONTROL

En un programa de control de la TB es indispensable un método de diagnóstico que entre otras características posea una alta sensibilidad con el fin de detectar animales infectados que constituyen focos potenciales de infección, para el resto de los animales del hato (11).

Los propósitos generales del control y erradicación de la TB, incluyen mejorar las posibilidades del productor pecuario, para aumentar su productividad, de comercializar sus productos en el mercado nacional e internacional, eliminar un factor restrictivo de la producción de leche y carne y evitar el riesgo de infección de tuberculosis de origen bovino en la población humana; entre los objetivos específicos esta prevenir la recaída de áreas y países donde ya ha sido eliminada la TB (31).

Las estrategias utilizadas para estos programas son entre otras, fortalecer la vigilancia epidemiológica, desarrollo y mejoramiento de componentes técnicos de los programas de erradicación; existen diferentes enfoques para el control de la TB, como son: 1. Prueba de intradermorreacción y sacrificio de animales reactivos positivos. 2. Prueba de intradermorreacción y separación de animales reactivos positivos; el primero ha sido ampliamente usado en EE.UU., Canadá, Nueva Zelanda y Australia, la enfermedad era de incidencia muy elevada en estos países, especialmente en el ganado lechero, pero actualmente la han reducido mucho (22, 31).

La literatura indica que las cuencas lecheras de las grandes ciudades son las que tienen las tasas de infección más altas, como por ejemplo: São Paulo (Brasil) 31.7% de prevalencia, Paraguay 24.4%, Lima (perú) 37.9% y Montevideo (Uruguay) 9.4% (8, 31).

Se menciona a Canadá, Cuba, Panamá, Estados Unidos, Irlanda, Suiza, Checoslovaquia, Dinamarca, Chipre, Líbano, Israel, Namibia, la península de Malasia y ciertas áreas de Paraguay como exentos de esta enfermedad, en Noruega la enfermedad resurgió y la incidencia en otros países se ha reducido a un 1% (8, 29, 31).

El diagnóstico rutinario en México se practica oficialmente aplicando la prueba de IDR simple caudal, con PPD de origen mamífero, debido a las ventajas técnicas y económicas que ofrece; el programa de control se basa en la identificación de los animales positivos a esta prueba y su consecuente sacrificio; el número de animales que resulta positivo a la tuberculina es elevado, lo que crea una posición delicada respecto a los criterios a seguir, es evidente que estos programas implican la erogación de fuertes capitales y requieren la participación decidida de autoridades y ganaderos (11).

En un reporte publicado en 1994, la Comisión Nacional Para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis, se menciona la situación actual de la campaña en México como sigue: Sonora en etapa de erradicación; Baja California Sur, Chihuahua, Durango, Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas en etapa de control intensivo, y el resto de la República en etapa de control (45).

OBJETIVOS

- Comparar las pruebas de intradermorreacción (IDR), interferón-gama (INF-G) e inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), basándose en la inspección postmortem (IP), para el diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina (TB).
- Establecer el valor diagnóstico de las pruebas de IDR, INF-G, ELISA e IP para la TB, basándose en la IP.
- Confirmar la relación inversamente proporcional entre la inmunidad celular y la inmunidad humoral en el curso de la TB.

HIPÓTESIS

- Si animales que se detectaron positivos por IDR, INF-G y/o ELISA demuestran lesiones sugestivas de TB en la IP entonces podrá afirmarse que la prueba fue sensible.
- Si animales que se detectaron negativos por IDR, INF-G y/o ELISA no demuestran lesiones sugestivas de TB en la IP entonces podrá afirmarse que la prueba fue específica.
- Si animales con altos índices de INF-G y/o un alto incremento en la IDR, demuestran bajos títulos de anticuerpos contra el antígeno micobacterial obtenido del cultivo de *Mycobacterium bovis* y viceversa, entonces la inmunidad celular y la humoral son inversamente proporcionales en el curso de la TB.

MATERIAL Y MÉTODOS

VACAS

Se utilizaron 31 vacas Gray Holstein para los experimentos, las cuales pertenecían a un rancho productor de leche ubicado en Coacalco, Edo. de México.

EQUIPO

Lector de ELISA

Lavador de ELISA

Campana de flujo laminar

Estufa bacteriológica

Rasuradora eléctrica.

Vernier graduado en milímetros.

Portapapeles, plumas y marcadores para ganado.

Torundas de algodón embebidas en alcohol al 70%.

Jeringas desechables (estériles) de 1.00 cc graduadas, con agujas de calibre 26 de 1.0 cm de largo.

Manga de manejo con sujetadores de cuello para ganado lechero.

Tubos al vacío con y sin heparina.

Placas de 24 pozos, para cultivo de células Costar.

Placas de 96 pozos, para pruebas de ELISA Nuonc.

Cuchillo de hoja fina.

Frascos de vidrio.

Cinta adhesiva.

Solución de formol al 10%, preparada con solución salina fosfática y con rojo de fenol como indicador de pH.

BIOLÓGICOS

PPD bovino y PPD aviar (PRONABIVE).

Prueba de INF-G, producto comercial denominado *Mycobacterium bovis* gama-Interferón Test Kit, Herd Chek, IDEXX, producido en USA.

Extractos de cultivo de *Mycobacterium bovis* de 12 semanas y de *Mycobacterium avium* de ocho semanas. (PRONABIVE).

PRUEBAS DE INTRADERMORREACCIÓN (IDR)

A cada una de las 31 vacas, se le practicó una prueba doble comparativa. Se les inoculó por vía intradérmica 0.1 ml de PPD bovino y PPD aviar (PRONABIVE), en el lado derecho del cuello en áreas separadas para cada uno, previamente rasuradas de forma cuadrangular, de 7 cm por lado aproximadamente y medidas en el centro con un vernier, levantando un pliegue en la piel; esta medida inicial se registró, aproximando su valor al número inmediato superior, cuando rebasó los 0.5 mm, y al inmediato inferior, cuando fue menor (6).

En el centro del área superior, localizada a 10 cm debajo de la cresta del cuello, se inoculó el PPD aviar y en el centro del área inferior, a 13 cm debajo de la anterior aproximadamente, se inoculó el PPD bovino, utilizando jeringas distintas para cada PPD (6).

La lectura de la prueba se realizó 72 horas después de la inoculación, observando, palpando y midiendo con el vernier, el centro de cada área rasurada, registrando la medida en la hoja de campo (6).

PRUEBA DE INTERFERÓN GAMA

La prueba se realizó para las 31 vacas, utilizando un producto comercial denominado *Mycobacterium bovis* gama-Interferon Test Kit, Herd Chek, IDEXX, producido en USA. Este es un análisis por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), que detecta el INF-G bovino en plasmas, obtenidos de muestras de sangre entera de bovinos, previamente estimulada con PPD. Tal y como se describe en el manual del productor (25); se utilizó sangre heparinizada, obtenida de cada una de las 31 vacas, con tubos al vacío, en el mismo día en que se realizaron las pruebas de IDR, previamente a la inoculación con PPD.

La sangre se incubo en placas de 24 pozos, dentro de las 16 horas siguientes a su obtención durante 24 horas a 37°C, dividiendo cada muestra en tres, la primera en ausencia del PPD (control), la segunda en presencia del PPD del *M. bovis*, la tercera en presencia del PPD del *M. avium*; esta última para identificar las reacciones inespecíficas al PPD de *M. bovis*.

Posteriormente se separo el plasma por centrifugación, y se analizó cada una de las tres muestras para verificar si el INF-G bovino estaba presente, de la siguiente manera: se agrego el plasma de cada una de la muestras (100 microlitros), a la placa de microtitulación, en diferentes pozos; estas placas están recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para el INF-G bovino; después se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora; durante este paso, el INF-G, en caso de existir, formó un complejo con los anticuerpos monoclonales inmovilizados en el recubrimiento.

Una vez incubadas, se aspiró el líquido contenido y se desechó, después se lavó cuatro veces cada pozo con 300 microlitros de solución de lavado, una vez terminado el último lavado se aspiró el líquido y se secó la placa golpeándola firme y suavemente sobre un material absorbente.

Posteriormente se agregaron 100 microlitros de anticuerpos monoclonales contra el INF-G bovino conjugado con peroxidasa, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente; estos anticuerpos se unen al INF-G ligado a los anticuerpos monoclonales inmovilizados.

Una vez incubadas, se aspiró el líquido contenido y se desechó, después se lavó cuatro veces cada pozo con 300 microlitros de solución de lavado, una vez terminado el último lavado se aspiró el líquido y se secó la placa golpeándola firme y suavemente sobre un material absorbente.

Una vez lavada y secada la placa, se agregaron 100 microlitros de sustrato enzimático (agua oxigenada más un cromógeno denominado tetrametilbencidina) a cada pocillo, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 100 microlitros de solución de paro a cada pocillo, una vez que se terminó de incubar la placa, para detener la reacción enzimática.

La placa se leyó en un espectrofotómetro, utilizando un filtro de 650 nanómetros de absorbancia, y utilizando aire como blanco.

PRUEBA DE ELISA

La prueba de ELISA se realizó para las 31 vacas, para lo cual se utilizó, suero obtenido de cada una, con tubos al vacío, el mismo día de la inoculación de PPD (previo a la misma, para la prueba de IDR y la obtención de sangre heparinizada para la prueba de INF-G, este suero se congeló, hasta su uso en días posteriores. La técnica se estandarizó de la siguiente manera (33, 34, 50):

los antígenos que se utilizaron para este motivo, fueron obtenidos a partir de extractos de cultivos de *M. bovis* de 12 semanas y de *M. avium* de 8 semanas, ninguno se sometió a calor (PRONABIVE).

Se agregó a cada pozo de las placas, excepto en aquellos que sirvieron de control, 5 microgramos del antígeno diluido en 0.1 ml de solución de carbonatos 0.1 M, pH 9.6, y la placa se incubó a temperatura ambiente, durante 24 horas (hasta que se secó). Se utilizaron placas distintas para cada antígeno, de manera que los sueros se probaron con ambos por separado.

A todos los pozos de cada una de las placas, se les agregó 350 microlitros de una solución de gelatina de cerdo al .1%, y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, después únicamente se retiró el contenido de los pozos, para agregar 100 microlitros de la misma solución y dejar incubando las placas durante 24 horas (hasta que secaron).

Se lavaron las placas 12 veces con agua bidestilada, 6 veces con una solución de PBS-tritón al .3%, 6 veces con una solución de PBS-tween 20 al .1% y 6 veces con una solución de PBS, agitándola en cada lavado y posteriormente se seco, golpeándola firme y suavemente en una superficie absorbente.

Se agregaron 0.1 ml a cada pozo, de cada suero problema diluido 1:500, en una solución de PBS, al .5 M de NaCl, gelatina de cerdo al .1%, tritón al .3%, EDTA al 10 mM (milimolar), y se incubaron durante 1 hora a 37°C de temperatura. Cada suero se probó por duplicado y tuvo un pozo control, que no tiene antígeno, para determinar las reacciones inespecíficas.

Se lavaron las placas 6 veces con una solución de PBS-tritón al .3%, 6 veces con una solución de PBS-tween 20 al .1%, 6 veces con una solución de PBS y 6 veces con agua bidestilada, agitándola en cada lavado y posteriormente se seco, golpeándola firme y suavemente en una superficie absorbente.

Se agregó a cada pozo, 0.1 ml de conjugado anti IgG de bovino (obtenida de borregos), con peroxidasa de rábano picante, diluido 1:3000 en una solución de tween 20 al .1%, EDTA 10 milimolar, PBS y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

Se lavaron las placas 6 veces con una solución de PBS-tritón al .3%, 6 veces con una solución de PBS-tween 20 al .1%, 6 veces con una solución de PBS y 6 veces con agua bidestilada, agitándola en cada lavado y posteriormente se seco, golpeándola firme y suavemente en una superficie absorbente.

Se agregó a cada pozo 0.1 ml del sustrato, preparado minutos antes de ser utilizado, de la siguiente forma (para una placa): 5 mg de o-fenil-diarnina, 3 ml de ácido cítrico .1 M, 3.2 ml de fosfato dibásico de sodio .2 M, 18.8 microlitros de peróxido de hidrógeno al 30% y 6.3 ml de agua bidestilada. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos exactamente; Posteriormente, se agregó a cada pozo 50 microlitros de solución ácido sulfúrico 2 M (solución de paro).

La lectura de la placa, se hizo en un lector de ELISA, utilizando un filtro de 490

nanómetros de absorbancia.

COLECCIÓN DE MUESTRAS EN RASTRO

Se realizó una colección de muestras en el rastro durante el sacrificio de las 31 vacas, obteniendo así, parte de los NL retrofaringeos, bronquiales, mediastínicos y de los pulmones (lóbulos craneales) de cada una de las vacas y en algunos casos, los nódulos linfáticos, mesenterios y preescapulares.

Las muestras se revisaron cuidadosamente por separado, realizando los cortes pertinentes en el parenquima de los órganos, para la observación plena de lesiones, en caso de existir.

RESULTADOS

PRUEBA DE IDR

Se calculó el resultado, obteniendo la diferencia entre la primera medida y la segunda (a las 72 hrs.); para clasificar a los animales probados, se utilizó la gráfica de interpretación de esta prueba, específicamente utilizando el criterio estándar, elaborada por la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina en México, por la Dirección de Campañas Zoonosanitari (6).

INTRADERMORREACCIÓN

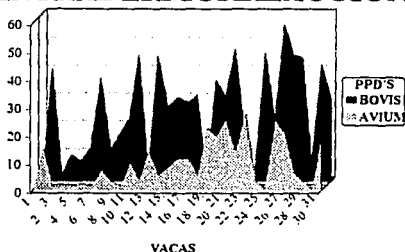


FIGURA No. 1: comparación del incremento en el grosor de la piel, de las 31 vacas, medidos con vernier 72 horas después de ser inoculadas con PPD bovino y PPD aviar en la región cervical.

La figura número 1, muestra los resultados de la IDR (doble comparativa cervical), realizada en los 31 animales utilizados en este estudio, se observa que en todos existió, un mayor incremento al PPD de M. bovis, con respecto al producido por M. avium.

PRUEBA DE INF-G

Se comprobó la validez del análisis del INF-G, de acuerdo a las normas establecidas por el productor, de manera que la diferencia entre el promedio de los controles positivos y el promedio de los controles negativos fuera mayor o igual que 0.500, y el promedio de los controles negativos fuera mayor o igual que 0.250 (25).

Se determinó el valor límite para cada animal, agregando 0.100 al valor del tubo 1 (control) para obtener un límite; la presencia o ausencia del INF-G bovino se determinó mediante la relación del valor del tubo 2 (PPD-Bovis) con el límite para cada animal (25).

Si el valor del tubo 2 fue menor que el valor límite, la muestra se clasificó como negativa al INF-G, si fue mayor o igual al límite como positiva al INF-G y, el resultado se comparó con el tubo 3 (PPD-Avium) (25).

Si la relación del tubo 2 con el tubo 3 fue mayor que 1.8 se consideró que el animal era preferentemente sensible al PPD de M. bovis, en caso de que la relación fuera menor a

0,7, se consideró que el animal fue preferentemente sensible al PPD de M. avium; la relación se estableció obteniendo un cociente de la división del valor del tubo 2 entre el tubo 1(25).

La figura número 2, muestra los resultados obtenidos con la prueba de INF-G, en las 31 vacas, nótese que al igual que en la figura número 1, los valores obtenidos a partir de la estimulación con PPD bovino, son mayores a los obtenidos con PPD aviar.

INTERFERÓN-GAMA

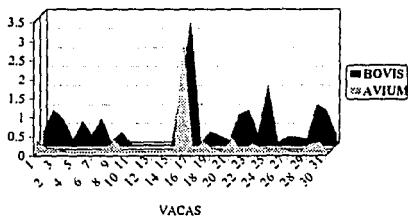


FIGURA No. 2: comparación de las densidades ópticas, obtenidas de la cuantificación de INF-G bovino, en plasmas los de las 31 vacas, 24 horas después de incubarse por separado con PPD bovino y PPD aviar.

PRUEBA DE ELISA

Se calcularon los resultados de cada muestra, obteniendo el promedio de las lecturas (densidades ópticas) del suero problema y sustrayendo el valor de su control en cada una de las placas.

Para clasificar los resultados como positivos se tomó el siguiente valor: mayor o igual a .4 densidades ópticas bovis; como se puede observar el cuadro número 1, este valor de corte permite identificar a 4 animales, con altos títulos de anticuerpos específicos contra *M. bovis*.

E L I S A		
DENSIDADES OPTICAS		
No.	BOVIS	AVIUM
1	.429	.862
2	.136	.113
3	.188	.172
4	.126	.142
5	.127	.123
6	.11	.12
7	.195	.095
8	.09	.0
9	.188	.001
10	.1335	.1395
11	.1835	.148
12	.185	.18
13	.1645	.098
14	.149	.0675
15	.199	.1
16	.129	0
17	.041	.048
18	.54	.0145
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	.0325	.0635
23	.027	.031
24	.07	0
25	.091	.007
26	.06	.0215
27	.111	.038
28	.05	.027
29	.497	.13
30	.497	0
31	.071	.1325
TOTAL	BOVIS	AVIUM
POSITIVOS	4	1
NEGATIVOS	27	30

La figura número 3, muestra los resultados obtenidos con la prueba de ELISA, utilizada en las 31 vacas; también aquí se observa la diferencia de la reacción entre los antígenos empleados, de *M. bovis* y *M. avium*, como en las figura 1 y 2, donde se marca la preferencia de la reacción al *M. bovis*.

ELISA

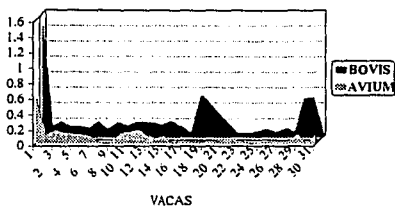


FIGURA No.3: comparación de las densidades ópticas, abtenidas de la cuantificación de IgG bovina específica contra antígenos obtenidos de extractos de cultivo de M. bovis y de M. avium.

INSPECCIÓN POSTMORTEM

Se revisaron cuidadosamente por separado los NL retrofaringeos, bronquiales, mediastínicos, mesentéricos, preescapulares y pulmones

Esta claramente documentado que el diagnóstico histopatológico de tuberculosis bovina es similar en más del 95% de veces al aislamiento del M. bovis. En datos no mostrados, la inspección postmortem fue 100% comparable con el histopatológico, además se logro el aislamiento de M. bovis en cerca del 40% de casos con lesiones visibles. Es por ello que nos atrevemos a usar términos como son la sensibilidad y la especificidad para discutir los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El cuadro número 2, muestra los hallazgos a la IP de las 31 vacas; nótese que los animales 1, 29, 30, tenían muchas lesiones en los NL mediastínicos y bronquiales, la vaca 1, además en los NL mesentéricos y en los supramamarios, estos últimos aquí no se muestran, este animal no reaccionó a las pruebas de IDR e INF-G; los animales 11, 18, 22, 26, solo tenía algunas lesiones menores de 1cm, no obstante que fueron positivos a la IDR y al INF-G, excepto el 18; es por ello que los animales 1 y 18 se consideran anérgicos.

INSPECCIÓN POSMORTEM

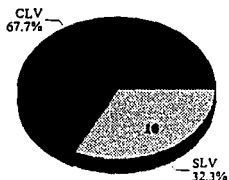


FIGURA No.4 comparación de la frecuencia de lesiones encontradas en el total de las vacas, recuerdese que el 83.7% de este total fué positivo a la IDR, sin embargo notamos que solo el 67.7% tuvo lesiones visibles en la IP (vease cuadro No.1 y figura No. 6); CLV: vacas con lesiones visibles, SLV: vacas sin lesiones visibles.

DISTRIBUCIÓN DE LESIONES NODULOS LINFÁTICOS

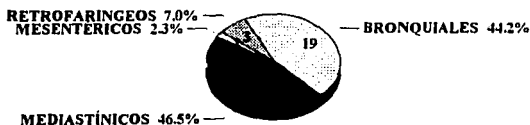


FIGURA No. 5: esquema de la distribución de las lesiones encontradas en la IP; obsérvese que los NL asociados mas íntimamente con el pulmón, son los mas afectados, lo cual es compatible con la patogénesis propuesta para la TB.

NÓDULOS LINFÁTICOS					
NO.	MEDIA	BRONQ	RETRO	MESEN	PULMÓN
1	+++	+++	slv	+++	slv
2	slv	slv	slv	slv	slv
3	slv	slv	slv	slv	slv
4	+++	+++	slv	slv	slv
5	++	++	slv	slv	slv
6	++	++	slv	slv	slv
7	+++	+++	slv	slv	slv
8	slv	slv	slv	slv	slv
9	+++	+++	slv	slv	slv
10	slv	slv	slv	slv	slv
11	slv	slv	++	slv	slv
12	slv	slv	slv	slv	slv
13	+++	+++	slv	slv	slv
14	++	++	slv	slv	slv
15	++	++	slv	slv	slv
16	+++	+++	slv	slv	slv
17	slv	slv	slv	slv	slv
18	+	slv	slv	slv	slv
19	slv	slv	slv	slv	slv
20	slv	slv	slv	slv	slv
21	++	+	+++	slv	slv
22	+	+	slv	slv	slv
23	slv	slv	slv	slv	slv
24	+	++	slv	slv	slv
25	slv	slv	slv	slv	slv
26	+	++	slv	slv	slv
27	+++	+	slv	slv	slv
28	+	++	+++	slv	slv
29	+++	++	slv	slv	slv
30	+++	+++	slv	slv	slv
31	+++	+	slv	slv	slv
TL	20	19	3	1	0

Cuadro No. 2: Relación de la distribución de lesiones encontradas en la IP de las 31 vacas, relacionando su número y tamaño; slv: sin lesiones visibles; +++: muchas lesiones y/o de tamaño mayor de 1 cm; ++: menos de 5 lesiones y/o menores de 1cm; +: de 1 a 2 lesiones menores de .5 cm; TL: total de lesiones

En la figura número 4, se compara la frecuencia de animales con lesiones con la de aquellos animales sin lesiones, observándose que poco más de la mitad del total de animales utilizados tenía lesiones visibles, sin embargo más de tres cuartas partes de este total reacciono positivamente a la pruebas de IDR e INF-G.

En la figura número 5, se muestran la distribución de las lesiones halladas a la IP, en los 31 animales, estos resultados demuestran la preferente localización de las lesiones tuberculosas, en NL asociados al tracto respiratorio, que a su vez se relaciona con la vía de entrada del agente etiológico de la TB.

La figura número 6, muestra la relación del número y tamaño de las lesiones encontradas en la IP de las 31 vacas, se puede notar que casi la mitad de animales tenía pocas lesiones y/o estas eran de un tamaño menor de 1cm (21).

RELACIÓN DEL TAMAÑO Y NÚMERO DE

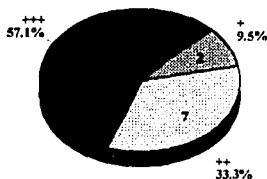


FIGURA No. 6: esquema de las lesiones halladas en la IP, en el total de las vacas, relacionando su número y tamaño.

El cuadro número 3, sintetiza los resultados obtenidos con los métodos empleados en el presente estudio, para el diagnóstico presuntivo de TB, en las 31 vacas utilizadas; como ya se mencionó en el cuadro No.1 los animales 1 y 18 fueron anérgicos, el primero muy probablemente por infección y el segundo por estar en una etapa temprana (véase cuadro No.2), estos dos fueron positivos a la prueba de ELISA; los animales 8, 10, 12, 17, 19, 20 y 25 no presentaron lesiones visibles a la IP, pero reaccionaron a la IDR y/o a el INF-G, por lo que constituyen casos de reactores sin lesiones visibles y para este estudio, animales falsos positivos; los animales 29 y 30 reaccionaron a todas las pruebas empleadas incluyendo a la IP, por lo que se estiman se encontraban en una etapa intermedia de la TB. Los resultados observados, evidencian una relación inversa entre inmunidad humoral e inmunidad celular en el curso de la TB.

COMPARACIÓN DE RESULTADOS				
NO.	IDR	INF-G	IP	ELISA
1	-	-	+	+
2	+	+	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-
8	+	+	-	-
9	+	+	+	-
10	+	+	-	-
11	+	+	+	-
12	-	+	-	-
13	+	+	+	-
14	+	+	+	-
15	+	+	+	-
16	+	-	+	-
17	+	-	-	-
18	-	-	+	+
19	+	+	-	-
20	+	+	-	-
21	+	+	+	-
22	+	+	+	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	-
25	+	-	-	-
26	+	+	+	-
27	+	+	+	-
28	+	+	+	-
29	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	+	+	+	-
TAN	5	7	10	27
TAP	26	24	21	4

CUADRO No.3:
relación de los resultados
obtenidos con el conjunto de
métodos de diagnóstico
empleados; TAN: total de
animales negativos; TAP:
total de animales positivos.

El cuadro número cuatro, muestra la frecuencia de los diversos patrones de respuestas obtenidos con el conjunto de las pruebas utilizadas; se puede observar que poco más de la mitad del total de animales reaccionó a las pruebas que miden inmunidad celular y esta reacción fue compatible con los hallazgos de la IP: sin embargo un gran número de animales reaccionó a estas pruebas sin tener lesiones visibles en la IP, constituyendo casos de reactivos sin lesiones visibles; también se observa que pocos animales reaccionaron a la prueba de ELISA, pero estos animales tenían lesiones visibles a la IP.

PATRONES DE RESPUESTA A LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS					
IDR	INF-G	ELISA	IP	TOTAL	%
+	+	-	+	16	51.6
+	+	-	-	4	12.9
+	-	-	-	3	9.77
+	+	+	+	2	6.45
-	+	-	-	2	6.45
-	-	+	+	2	6.45
-	-	-	-	1	3.25
+	-	-	+	1	3.25
TOTAL				31	100

Cuadro No. 4: Relación de la incidencia de los distintos patrones de reacción, obtenidas con el conjunto de métodos de diagnóstico empleados.

La figura número 7, muestra una comparación del número de reactores positivos a las pruebas empleadas; nótese que la prueba que más se semeja a la IP es la INF-G

ANIMALES POSITIVOS

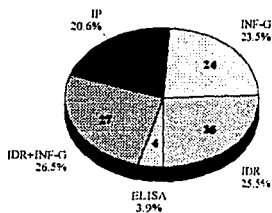


FIGURA No. 7 comparación de los reactores negativos, obtenidos mediante los métodos utilizados, para el diagnóstico de TB en las 31 vacas.

La figura número 8, muestra una comparación de los animales reactores negativos a las pruebas empleadas; se puede notar que el resultado que más se asemeja a la IP, es el obtenido con la suma de los resultados de las prueba de IDR e INF-G.

ANIMALES NEGATIVOS

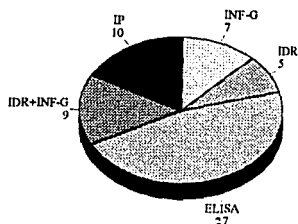


FIGURA No. 8: comparación de los reactores negativos, obtenidos mediante los métodos utilizados, para el diagnóstico de TB en las 31 vacas.

El cuadro número cinco, muestra una comparación de la sensibilidad y la especificidad obtenida en cada prueba empleada en este trabajo, basando los criterios en la IP; se puede observar que la mayor sensibilidad se obtuvo con la prueba de IDR y la mayor especificidad con la prueba de ELISA, aunque esta última careció de sensibilidad en el diagnóstico de TB; la especificidad y la sensibilidad máximas se obtuvieron con la suma de los resultados obtenidos con la prueba de IDR e INF-G.

COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD		
PRUEBAS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
IDR	90,4 %	30 %
INF-G	85,7 %	40 %
IDR+INF-G	90,4 %	60 %
ELISA	19 %	100 %

CUADRO No. 5: comparación de la sensibilidad y especificidad, de cada prueba

DISCUSIÓN

Los procedimientos utilizables con vista al diagnóstico pueden, en teoría, derivarse de todos los métodos de inmunología; en atención a la importancia y amplitud de la tarea que se les asigna, deben responder a un cierto número de criterios que pueden jerarquizarse del modo siguiente:

- Deben ser sensibles, es decir, señalar todos los animales tuberculosos (positivos verdaderos)
- Deben ser específicos, o sea, que señalen todos los animales tuberculosos, pero solamente éstos (discriminando los negativos)
- Deben resultar de un costo tal, que sea compatible con las necesidades de una intervención masiva y repetida año tras año, sobre el conjunto de la ganadería (20).

Como todos los métodos biológicos, las reacciones a la tuberculina tienen fallos, el número de animales positivos a la IDR en México es muy elevado, si se toma en cuenta que de acuerdo a la campaña de control y erradicación de la TB estos deben ser sacrificados. se hace evidente la incoestabilidad de dicho criterio (13).

La eficacia en el diagnóstico de la TB va acompañada de dos riesgos, el primero es el no diagnosticar animales tuberculosos y el segundo es considerar como positivos animales no tuberculosos, actualmente puede que su importancia sea menor que el anterior, sin que por ello pueda considerarse despreciable ya que su incremento es predecible: estos dos son antagónicos entre sí (20).

Los resultados de evaluaciones de la prueba de IDR reportados en la literatura, mencionan que la prueba simple caudal posee una sensibilidad de entre 81 a 72% y una especificidad del 78-96 % aproximadamente (56).

Animales reactivos positivos sacrificados, de hatos probados regularmente con la IDR, donde se ha logrado disminuir la prevalencia de TB, en la inspección postmortem no presentan lesiones sugestivas de TB, de lo anterior se deduce que la especificidad de la IDR disminuye junto con la prevalencia de TB, aumentando así el número de falsos positivos (9,13,15).

En un estudio reciente realizado por Wood y colaboradores, la prueba de INF-G demostró ser más sensible y específica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, en comparación con la prueba de IDR; la cual tuvo alta especificidad y baja; además menciona que cuando se suman los resultados de la prueba de IDR y la prueba de INF-G se obtiene una alta especificidad y la más alta sensibilidad (57).

Nosotros escogimos la prueba de IDR doble comparativa cervical, por que discrimina aquellas infecciones causadas por micobacterias del complejo avium y atípicas, además de que la sensibilidad de la IDR es mayor cuando se aplica en el cuello, en comparación con la aplicada en la región caudal; los juicios emitidos en este trabajo, son basados, principalmente en la IP (2, 3, 11, 13, 20).

En el presente estudio, la prueba de IDR detectó al 90.4% y la prueba de INF-G al 85.7% de animales IP+; la prueba de IDR detectó al 30% y INF-G al 40 % de animales IP-; Cuando se sumaron los resultados obtenidos en las dos pruebas se detectó al 90.4% de animales IP+ y al 60% de animales IP-; por lo que la prueba de IDR fue más sensible que la de INF-G, pero esta última fue más específica que la de IDR; además se observó que la suma de los resultados obtenidos con estas dos pruebas permite una mayor especificidad en el diagnóstico de TB.

La razón de la mayor sensibilidad de la prueba de IDR en comparación con la de INF-G, puede ser debida a que los valores de corte preestablecidos para esta última prueba no sean del todo correctos, debido a que existe un rango bastante amplio que no está clasificado, específicamente del .7 al 1.8 de densidades ópticas.

Es muy común, que hatos con baja incidencia de tuberculosis resultan en pruebas posteriores con elevado índice de reactores a la tuberculina (recaídas), esto es posible debido a que las pruebas no logran detectar animales anérgicos y animales en etapas tempranas de la enfermedad o con lesiones latentes que pueden convertirse en fuente de infección en un periodo incierto, que puede ser corto (2,3,14,32,33,37,42).

Animales en etapas tempranas de la enfermedad han sido detectados por la prueba de INF-G en estudios realizados en otros países; los resultados obtenidos en el presente trabajo no lo demostraron, es muy posible que se requieran trabajos que utilicen una población mayor (32,33).

El problema de los reactores falsos negativos puede ser minimizado por la eliminación de todos los animales que reaccionen a la prueba de tuberculina en la prueba inicial; en las pruebas siguientes aparentemente puede incrementar el número de animales infectados con *M. bovis*, encontrando una respuesta al PPD de *M. bovis* en poblaciones en las que la infección persiste; este criterio es bien aceptado por países en donde existe un acuerdo con el gobierno para recompensar aquellas pérdidas por animales positivos a la IDR (48).

En un estudio realizado por Ritacco y colaboradores se menciona que no obstante que la prueba de ELISA fue menos sensible y específica que la prueba de INF-G, es posible emplearla en animales con lesiones diseminadas debido a que éstos muestran un elevado nivel de anticuerpos y una baja respuesta inmune mediada por células; Plackett y colaboradores señala que la prueba de ELISA no es una alternativa similar a la prueba de tuberculina, pero puede detectar vacas anérgicas, Auer concluye que los valores de la prueba de ELISA dependen de su uso conjuntamente con la prueba de IDR o INF-G, para detectar una proporción de vacas tuberculosas anérgicas; en un estudio reciente realizado por Wood y colaboradores, la prueba de ELISA mostró alta especificidad y una baja sensibilidad comparada con la IDR y la prueba de INF-G. (37,42, 57).

La prueba de ELISA en este trabajo detectó altos niveles de anticuerpos en cuatro animales, dos de ellos fueron positivos a la IDR, INF-G y a la IP, uno de los otros dos presentó únicamente una lesión en el NL mediastínico, menor de .5 cm. por lo que debió ser un caso de infección temprana, el otro animal no obstante que presentaba lesiones diseminadas en diversos nódulos y emaciación evidente fue negativo a las otras pruebas, por lo que constituyó un caso típico de anergia por infección; este último caso hace evidente que no todos los animales clínicamente enfermos son eliminados de un hato prontamente, tal como lo suponen las autoridades encargadas de la campaña de control y erradicación de la TB; estos hallazgos permiten suponer una relación inversamente proporcional entre inmunidad humoral y celular en el curso de la TB (39).

La mayoría de los animales mostró niveles muy bajos de anticuerpos sin tomar en cuenta los cuatro que tuvieron niveles altos, así mismo se observó una pequeña diferencia entre los niveles de los animales negativos y positivos a la IP (promedio de .13 densidades ópticas para los animales IP- y .8 promedio de los IP-); no obstante lo antes mencionado, se puede observar la diferencia de la reacción, entre los antígenos de *M. bovis* y *M. avium*, ya

que en todos los animales fué mayor la reacción al primero de estos dos, seguramente esto se debe a que en los extractos utilizados como antígenos, existen epitopes específicos de cada especie.

En este estudio, estableciendo un valor de corte de $> 6 = 4$ para animales positivos se obtiene una sensibilidad bajísima y una especificidad alta con la prueba de ELISA (densidades ópticas); posiblemente un valor de corte de 1 permita discriminar solo aquellos casos de anergia por infección.

Los resultados obtenidos con la prueba de ELISA no permiten establecer un punto de corte confiable para descartar animales positivos o negativos, debido a que el rango entre las reacciones es sumamente pequeño en la mayoría de los casos, pero al asociar estos valores con los resultados obtenidos en las pruebas que miden inmunidad celular es muy posible detectar animales con tuberculosis diseminada.

En las primeras etapas de control de hatos con elevados índices de infección no se realizó anteriormente ningún saneamiento, cerca del 90% de los bovinos reactivos puede presentar lesiones postmortem(41)

La literatura menciona que, las lesiones tuberculosas encontradas en la inspección postmortem se presentan en nódulos linfáticos asociados con el tracto respiratorio en aproximadamente 90% de reactivos positivos con infección confirmada de tuberculosis (histopatológico y aislamiento), estas lesiones en nódulos linfáticos respiratorios son secundarias a aquellas del pulmón, sin embargo solo del 1% al 2% de estos animal y además el 63% de los pulmones con lesiones solo tienen una lesión presente, generalmente encontradas en los lóbulos diafragmáticos; sin embargo cuando se hace un estudio de estos mismos pulmones, dividiéndolos en secciones de aproximadamente 5 cm. las lesiones se hacen evidentes hasta en un 70% de los casos (14,26).

En la inspección postmortem se pudo observar lesiones típicas de tuberculosis en los NL de 21 animales lo cual representa un 67.74% del total, de estos animales solo el 57.1 % tuvo lesiones que eran mayores de 1 cm o su número era mayor de 5, tomando en cuenta que en el hato al que pertenecían estos animales no se había realizado diagnóstico de TB con anterioridad, se confirma la alta incidencia de reactivos positivos a pruebas que miden inmunidad celular con lesiones visibles en la inspección postmortem en este tipo de hatos; sin embargo los hallazgos no permiten presumir que los animales reactivos positivos fueran casos de enfermedad, en la gran mayoría de los casos, o que constituyeran un foco de infección tanto para el ganado como para el ser humano; es más factible sospechar que estos animales lograron, después de un tiempo de ser infectados, contrarrestar la infección y localizarla.

Todos los animales IP+ tenían lesiones en los nódulos linfáticos del tórax, lo cual es compatible con la tuberculosis bovina, sin embargo ninguno tenían lesiones visibles en el pulmón, pero es muy posible que existieran lesiones microscópicas o cicatrices, pues las lesiones en los nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio son secundarias siempre a las del pulmón, en este caso se puede deber a que los animales en general estaban bien alimentados y tenían buen estado de carnes, por lo cual se deduce que su sistema inmune logró en cierto modo contener la infección y localizarla, eliminando el peligro de diseminación de la enfermedad (14,48).

Las lesiones encontradas nos sugieren el padecimiento de la enfermedad en este caso de tuberculosis, es por ello importante señalar que casi el 40 % de animales positivos a

las pruebas empleadas no tenían lesiones; por lo cual se concluye que estas pruebas indican solo un estado inmunitario en el cual hay respuesta a un antígeno ya conocido, pero no detectan siempre casos de enfermedad (2, 3, 13, 41, 49).

La exploración y aislamiento de animales durante 3 días es indispensable para la aplicación de la IDR, representa un manejo difícil sobre todo en explotaciones de tipo extensivo, por lo cual es necesaria una prueba que no exija tal manejo o que presente ventajas operacionales; además la prueba de IDR con PPD bovino es un potente estimulador de la producción de anticuerpos en animales infectados con *M. bovis*; por otro lado la prueba de INF-G no compromete el estado inmunológico del animal, así la repetición inmediata de la prueba en animales sospechosos es posible, y los resultados son disponibles de 24 a 48 horas después; además no requiere de un excesivo manejo de los animales y la muestra colectada puede ser útil para el diagnóstico paralelo de otras enfermedades. (3, 37, 39, 57).

Es necesario realizar exámenes posmortem de los animales eliminados de un hato en el cual se practique la prueba de IDR, esto permite establecer con más certeza el grado de diseminación de la enfermedad, además de que permitirá emplear diversos criterios de acuerdo al número de reactores con lesiones que se encuentren.

Con el objetivo de evitar o reducir al máximo el sacrificio innecesario de bovinos es necesario incluir en los criterios para el desecho datos como son la alta producción láctea, condición general, la edad del individuo y número de partos entre otras; evitando el sacrificio de animales sin historia o cuadro clínico de TB, con buen estado de carnes, jóvenes, con buena producción o de 1 a 2 partos y venta al rastro de animales de alta calidad genética por ser reactores a la tuberculina; además se deben realizar estudios de apoyo como el INF-G, la ELISA y IP.

La erradicación de la TB se puede lograr con cualquier prueba de diagnóstico, siempre y cuando los criterios implementados por los responsables directos de la campaña, logren persuadir a los ganaderos para que modifiquen su actitud, por cierto muy respetable.

Se deberán promover líneas de investigación encaminadas a la purificación de proteínas y elaboración de antígenos específicos, con lo cual aumentaría la sensibilidad y la especificidad de las pruebas y disminuiría el número de reactores falsos positivos y por consiguiente las mermas por concepto de desechos; en la elaboración y aplicación de vacunas, así como planteamiento y utilización de tratamientos.

CONCLUSIONES

- Se concluye que existe una gran similitud entre las pruebas de IDR e INF-G, que el diagnóstico de TB, mediante estas pruebas conjuntamente, puede disminuir el número de falsos positivos, debido a la mayor especificidad de la INF-G.

Es importante seguir determinando la eficiencia de la prueba de INF-G usándola a la par de la IDR, ya que es muy posible que resulte ser una prueba útil en etapas avanzadas de un programa de erradicación, pues como lo ha demostrado es una prueba más específica y tal como se ha mencionado, el número de reactores a la IDR con lesiones visibles en estas etapas, aumenta gradualmente.

- Los resultados obtenidos con la prueba de ELISA no permiten establecer un punto de corte confiable para descartar animales positivos o negativos, debido a que el rango entre las reacciones es sumamente pequeño, sin embargo se determinó su utilidad para discriminar casos de anergia por infección de TB.

No se debe minimizar la importancia de los animales anérgicos por resultar ser pocos en una población grande, estos animales poseen la capacidad de diseminar la enfermedad, además es importante tomar en cuenta que el agente ha logrado transponer todas sus defensas y a la vez ha aumentado su virulencia; es por ello que la prueba de ELISA puede ser utilizada en animales que hayan resultado ser negativos o sospechosos en las pruebas que miden inmunidad celular, ya que es la única que ha demostrado detectar animales anérgicos o con enfermedad avanzada.

- La IP demostró ser una mediada útil y bastante confiable, para determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunodiagnósticas empleadas en el presente estudio; es necesario realizar exámenes postmortem de los animales eliminados de un hato en el cual se practique la prueba de IDR, esto permite establecer con más certeza el grado de diseminación de la enfermedad, además de que permitirá emplear diversos criterios de acuerdo al número de reactores con lesiones que se encuentren, sobre todo si se relaciona con los resultados obtenidos con las pruebas antes mencionadas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abou-Zeid, C.; "Cross-reactivity of antigens from the cytoplasm and cell walls of some corynebacteria and mycobacteria"; The journal of infectious diseases, Vol. 151, No. 1, January 1985, p. 170-181.
2. Billman, H. J.; "A comparison of the interferon gama assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle"; Australian Veterinary Journal, Vol. 69, No.2, 1992, p.25-28.
3. Beer J., Enfermedades infecciosas de los animales domésticos; Enfermedades producidas por bacterias y hongos e intoxicaciones, 1a. edición, Zaragoza España, editorial ACRIBIA, S.A., 1981, Tomo II, Cap. 25, p. 228-248.
4. Blood, D.C., Medicina veterinaria; Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino, 7a. edición, Madrid España, editorial Interamericana McGraw-Hill, 1992, Volumen I, Cap. IV, p.764-785.
5. Carter, G.R.; Essentials of veterinary bacteriology and mycology ; Lea & Febiger, 4th edition, 1991, Cap. 11, p. 120-125.
6. Colegio nacional de médicos veterinarios zootecnistas; Manual de normas y procedimientos de la campaña nacional contra la tuberculosis bovina; programa de acreditación de médicos veterinarios zootecnistas; SARH, México 1992, p. 30-35.
7. Cottral E. G., Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria; 1a. edición en español, México, D.F. ; editorial Ediciones Científicas. La Prensa Médica Mexicana, 1986, Cap. 47, p.468-473.
8. Doseti, D.J.G.; "Análisis del daño económico producido por la tuberculosis bovina en once establos lecheros durante un programa de control"; tesis para obtener el título de Médico veterinario zootecnista, FES-Cuautitlán; Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1993, p.40.
9. Duffield B.J. "An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in northern Queensland", Australian Veterinary Journal. Vol 66, No. 9, 1989, p.307-308.
10. Eleveño, J. R; Análisis de la producción e importación de leche de vaca en México durante el período de 1985-1991; Tesis para obtener el título de Médico veterinario zootecnista, FES-C, Estado de México, 1992, p. 47.
11. Flores, C. R., Programa de acreditación de médicos veterinarios Zootecnistas; Material para la actualización técnica en brucelosis y tuberculosis bovina; 1a. edición, México; Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México, 1990, p. 5-10.
12. Francis, J.; Tuberculosis in animals and man: A study in comparative pathology; Cassell and company limited London; First published 1958, chapter II, p.11-36.
13. Francis, J., "The sensitivity and specificity of various tuberculin test using bovine PD and other tuberculins". Veterinary Record 103, 1978, p. 420-425.
14. Gázquez, O. A., Patología veterinaria, 1a. edición, Madrid España, editorial Interamericana McGraw-Hill, 1991, Cap. 9, Sub. 9.3, p. 406-415.
15. Hall, M.R., "Use of sodium deoxycholate to extract cell wall components of virulente *Mycobacterium bovis*" American Journal of Veterinary Reserch, Vol. 47, No. 12, 1986, p. 2572-2576.
16. Hanna, J., "Use of PD phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis"; Research Veterinary Science

1989, 47, p. 43-47.

17. Howard, G. J., Enfermedades infecciosas de los animales domésticos, 4a. edición en español, México D.F., editorial La prensa médica mexicana, S.A., 1983, Cap. 54, Sub. 54.1, p. 230-252.

18. Howard, M. J. "Eficacia terapéutica de los interferones"; Investigación y ciencia, julio de 1994, p. 40-47.

19. Lesslie, I. W.; "Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PD for testing cattle"; Veterinary Record (1975), 96, (part. 1,2 and 3), p. 332-341.

20. Lucas, A.; "Patología de la producción láctea, tercera parte "Métodos actuales de diagnóstico de la tuberculosis bovina"; 1a. edición, España, León, editorial Academia, 1968, tercera parte, p. 129-211.

21. McIlroy, S. G.. "Pulmonary lesions and Mycobacterium bovis excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle"; Veterinary Record, June 28 1986, 118, p. 718-721.

22. Merck & CO., Inc., El manual de Merck de veterinaria; Un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades, para el veterinario, 3a. edición en español, Madrid España, editorial Ediciones Centrum Técnicas y Científicas, S.A., 1988, p. 463- 469.

23. Minden P., " A Chemically synthesized peptide which elicits humoral and cellular immune responses to mycobacterial antigens"; Infection and immunity, september 1986; California, U.S.A., Vol 53, No. 3 , p. 560-564.

24. Moguel, N. J.M.; "Relación entre la prueba de intradermorreacción, hallazgos postmortem y estudio bacteriológico en el diagnóstico de tuberculosis bovina"; tesis para obtener el título de Médico veterinario zootecnista; FES-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, México 1981, p. 55.

25. Mycobacterium bovis, gama-Interferon Test Kit, Herd Check, IDEXX, Laboratories Inc., Westbrook, Maine 04092 U.S.A. p.11.

26. Neill, S.D., "Isolation of Mycobacterium bovis from the respiratory tracts of skin test-negative cattle.", The Veterinary Record (julio 1992) 131, 45-47.

27. Neill, S.D., "Deteccion of Mycobacterium bovis in skin test-negative cattle whit an assay for bovine interferon-gama", The Veterinary Record (august 1994) 135, 134-135.

28. O.P.S., O.M.S., B.I.D., Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina; Enfermedades cuarentenables, cuarentena animal, 1a. edición, editorial O.P.S., O.M.S., B.I.D., 1986, p.179-183.

29. O.P.S., O.S.P., O.M.S.; Salud Pública Veterinaria; 525 Twenty- thir Stree, N.W., Washington, D.C. 20037, EEUU, 1994, p. 3.

30. Olsen, R. G., Inmunología e inmunopatología de animales domésticos, 1a. edición en español, México D.F., editorial El manual moderno S.A. de C.V., 1983, p.173-174.

31. Pan/American health organization, Pan American samitary bureau, regional office of the World health organization, International meeting on the eradication of bovine tuberculosis in the americas; Saltillo, Coahuila, México, Nov.1991, p.18-20.

32. Plackett, P.; " An ELISA for the detection of anergic tuberculuous cattle". Australian Veterinary Journal, January 1989, Vol. 66, No.1, p. 15-19.

33. Pearce, P.R.; "Comparison of blocking agents for ELISA"; Quadrant research

foundation, Cambridge research laboratories, Cambridge, England; Nunc bulletin, No.7, December 1989; Denmark, Reoskilde, p. 1-8.

34. Peter, E.; "Blocking agent and detergent in ELISA"; Nunc bulletin, No. 9, June 1991; Denmark, Reoskilde, p. 1-4.

35. Ponce de León, R.S.; "Tuberculosis: La epidemia regresa", Página médica, Columna semanal, La Jornada No. 249, 20 de marzo de 1994, México D.F. p. 44.

36. Radunz, B.L., "Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat test", Australian Veterinary Journal, June 1985, 62, No.6, p. 191-194.

37. Ramírez, Casillas I.C.; "Diagnóstico de tuberculosis bovina por pruebas diferentes a la tuberculinización"; Memorias de cursos previos a la III Reunión de Egresados en Patología Veterinaria y Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.; México, D.F. octubre de 1992, p. 59-65.

38. Ritacco, V. MD.; "Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis"; Journal of veterinary medicine, series B, 1990, 37:1, p. 19-27.

39. Ritacco, V. MD., "Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis"; Research in veterinary science, 1991, 50: 3, p. 365-367.

40. Roitt, I.M. "Inmunología fundamentos"; 7a. edición; editorial Medicina panamericana, Madrid, España 1991, cap. 9, p. 165-189.

41. Rosenberger G., Enfermedades de los bovinos. 1a. edición en español, República oriental del Uruguay, editorial Hemisferio sur S.A., 1983, Tomo II, p.139-151.

42. Rothel, J.S.; "A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle"; 1990 Australian Veterinary Journal, 67, p. 134-137.

43. Sandoval, V. J. A.; "Primera tuberculinización realizada en el hato de bovinos productores de leche del rancho ALMARAZ, como prueba inmunodiagnóstica"; tesis para obtener el título de Médico veterinario zootecnista, FES-Cuautitlán; México, D.F. 1980, p. 27.

44. Santiago Cuetos José Salim. Programa de acreditación de médicos veterinarios zootecnistas; material para la actualización técnica en brucelosis y tuberculosis bovina, Bases inmunológicas de la tuberculinización; 1a. edición, México; Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México, 1990, p.11-15.

45. S.A.R.H.; La salud animal en México; Informe Sexenal 1988-1994, Subsecretaría de ganadería, Dirección General de Salud Animal, p. 24-25.

46. Scalan, CH.M., Introducción a la bacteriología veterinaria, 1a. edición, Zaragoza España, editorial ACRIBIA,S.A., 1988, Cap. 25, p. 555.

47. Thoen, C.O., "Mycobacterium bovis Infection in cattle: Pathogenesis"; Department of Microbiology and Preventive Medicine Iowa State University Ames, Iowa 5001; Simposio de "Tuberculosis Bovina"; XIV Congreso panamericano de ciencias veterinarias, Memorias de los trabajos presentados en el congreso realizado en Acapulco, Gro; México, del 9 al 15 de octubre de 1994, p. 492-494.

48. Thoms, C.J.; "Shared epitopes between mycobacteria and other microorganisms", Research in Veterinary Science 1986, 41, p. 275-276.

49. Tizard, I; Inmunología veterinaria, 3a. edición en español, México D.F., editorial Interamericana McGraw-Hill, 1989, Cap. IV, Sub. 23, p. 414.

50. Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories, INC, Virginia, U.S.A., 1980.

51. Wood, P.R.; "Development of a simple, rapid *in vitro*" 1990 Research Veterinary Science, 49, p. 46

52. Wood, P.R., " A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis.", Veterinary Microbiology , Amsterdam Alemania, 31 (1992), p. 71-79.