



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“Evaluación de la prueba de Inmunoperoxidasa para el diagnóstico
complementario de la Tuberculosis bovina, en explotaciones de
ganado lechero”.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
MA. ADRIANA SOSA CASO

Asesores: MVZ. Gilberto Ochoa G.
QFB. Luis Bojórquez Narváez

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

INSTITUTO NACIONAL
 DE ESTUDIOS DE
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M. -
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES-CUAUTITLAN



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

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

DEPARTAMENTO DE
 EXAMENES PROFESIONALES

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Evaluación de la Prueba de Inmunoperoxidasa para el diagnóstico complementario de la Tuberculosis bovina en explotaciones de ganado lechero "

que presenta la pasante: María Adriana Sosa Caso
 con número de cuenta: 7942402-2 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

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 FAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de julio de 1997

PRESIDENTE	<u>MVZ. Sergio Cortéz y Huerta</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Gilberto Ochoa Uribe</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Tonatiuh Cruz Sánchez</u>	
PRIMER SUPLENTE ^{M.}	<u>en C. Alejandro Martínez Rodríguez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Raúl Radillo Rodríguez</u>	

**A la memoria de mis padres Q.E.P.D.
En quienes siempre pienso para
seguir adelante.**

**A mis hermanas:
Patricia, Gabriela y Enriqueta
Por lo que nos mantiene unidas.**

**Un agradecimiento muy especial
al QFB. Luis Bojórquez Narváez por
su orientación, apoyo y paciencia para
la realización de este trabajo.**

**Al MVZ. Gilberto Ochoa Uribe por su
valiosa cooperación en la revisión y
asesoría de este trabajo.**

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	4
III. Generalidades	6
1. Antecedentes	6
2. Agente Etiológico	
3. Composición Química	
4. Composición Antigénica	7
5. Resistencia Ambiental	8
6. Patogénia	
7. Inmunidad	10
8. Tratamiento	11
9. Control	
10. Salud Pública	13
11. Métodos de Diagnóstico	14
IV. Objetivos	22
V. Material y Métodos	23
VI. Resultados	32
VII. Discusión	37
VIII. Conclusiones	40
IX. Bibliografía	42
X. Apéndice	47

I. RESUMEN

El efecto de la Tuberculosis bovina en la economía de los ganaderos y el riesgo que representa como zoonosis, son razones fundamentales para establecer programas y proyectos de lucha contra esta enfermedad. Estos programas, se basan en el diagnóstico y la eliminación de reactores a la tuberculina, observándose en algunas ocasiones que los animales reactores que se envían a rastro no presentan lesiones macroscópicas características, lo que provoca desmotivación y falta de participación del ganadero en las campañas zoosanitarias. En atención a esta situación, se plantea la evaluación de la técnica de Inmunoperoxidasa, como prueba complementaria al diagnóstico de la Tuberculosis bovina, que detecta anticuerpos contra *Mycobacterium bovis* en sueros de animales enfermos.

Para este estudio se emplearon 375 muestras de sueros de bovinos, que se distribuyeron en 5 grupos al azar, en base a la procedencia y al tipo de prueba tuberculínica que se aplicó a los animales. Los sueros de los grupos I, II y III pertenecen a 200 bovinos que se les practicó la prueba caudal y provienen de los estados de Sonora, Coahuila y Puebla respectivamente, presentando un 55.5% de reactores. El grupo IV, se formó con 125 sueros de animales sometidos a la prueba doble comparativa procedentes del estado de Sonora, con una incidencia de 49.6%; finalmente el grupo V, quedó como control negativo empleando 50 sueros de bovinos ubicados en Mexicali, Baja California procedentes de un rancho que en los últimos 5 años no ha presentado reactores a la

tuberculina, en estos animales se repitió la prueba doble comparativa, encontrando 0.0% de reactivos.

Los 375 sueros se sometieron a la prueba de Inmunoperoxidasa (PIP), empleando microplacas sensibilizadas con PPD bovino modificado, la reacción antígeno - anticuerpo se reveló con Proteína G - peroxidasa usando como sustrato 3 - amino, 9 etil carbazol. Los sueros pertenecientes a los grupos, I, II y III, presentaron un 27.5% de positivos y los del grupo IV, un 30.4% en tanto que los del V, 0.0%.

Veinte bovinos, doce reactivos a la prueba caudal del grupo I y ocho del grupo IV, reactivos a la prueba doble comparativa, ambos procedentes del estado de Sonora, se enviaron a sacrificio para estudios a la necropsia y obtención de muestras para histopatología y bacteriología.

De estos, 18 presentaron lesiones características de tuberculosis a la necropsia. Diez fueron positivos a la prueba histopatológica, mismos que resultaron positivos a la prueba de inmunoperoxidasa, de estos se lograron 9 aislamientos, de los que se enviaron a tipificar 6 al Instituto Panamericano de Protección en Alimentos y Zoonosis (INPPAZ), resultando 4 positivos a *Mycobacterium bovis* y 2 a *Mycobacterium spp* atípicas.

En referencia a los resultados positivos, la prueba de Inmunoperoxidasa presentó una correlación con respecto a la tuberculina caudal de 49.5% y a la doble comparativa de 61.3%. La prueba de inmunoperoxidasa presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad de 90.9 a 100%, en animales tuberculosos; por lo que puede usarse como prueba complementaria a la tuberculina sobre todo en hatos de bovinos destinados a la producción de leche, en virtud de que en aquellos que

resulten positivos, aumenta la probabilidad de encontrar lesiones a la necropsia y se puede evitar el envío a sacrificio de animales "falsos positivos a la tuberculina" que no sufren la enfermedad y presentan buena producción de leche.

En base a lo anterior se concluye que la técnica de Inmunoperoxidasa, es de utilidad en el diagnóstico complementario de la Tuberculosis Bovina y puede llegar a representar una herramienta útil para el avance de las campañas zoonosanitarias contra la enfermedad.

II. INTRODUCCION

Se han publicado las ventajas que ofrece el uso de pruebas para el diagnóstico de Tuberculosis bovina que detecten anticuerpos circulantes del tipo IgG₁, contra *Mycobacterium bovis*, empleando la técnica de análisis inmunoabsorbente ligado a enzima ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), en este sentido la prueba resulta útil en hatos donde la incidencia de la enfermedad ha disminuido y aumenta el número de falsos positivos a la tuberculina. Asimismo, se ha demostrado que es una herramienta importante en la detección de animales anérgicos, este fenómeno se presenta en tuberculosis avanzadas con alto grado de diseminación debido a que en los animales se producen títulos elevados de anticuerpos tipo IgG₁. La prueba de ELISA es menos sensible en aquellos animales que sufren una infección localizada, de la cuál se pueden recuperar en forma natural sin someterlos a ningún tratamiento. (3,7,22).

La baja sensibilidad de la prueba de ELISA la descarta como prueba de uso en Campañas Zoonosanitarias, sin embargo, aún cuando no detecta animales infectados, su alta especificidad (95%) y su capacidad para identificar una alta proporción de bovinos con tuberculosis activa (74%) la hacen una herramienta útil como prueba complementaria a la prueba tuberculínica para la toma de decisiones en la eliminación de reactivos en hatos lecheros con baja incidencia y en la detección de animales anérgicos. Aumenta la probabilidad de observar lesiones características en los estudios de necropsia, eliminando así la incertidumbre de sacrificar animales reactivos, no enfermos de Tuberculosis bovina, con buena producción láctea. (22)

Desafortunadamente la prueba de ELISA presenta desventajas ya que para su aplicación se requiere de personal entrenado y equipo especializado con un costo aproximado de \$50.000.00 pesos disponible únicamente en centros de Investigación y algunas Universidades, cuyo objetivo fundamental no es el diagnóstico. Por tal razón, PRONABIVE (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) planteó la necesidad de contar con una prueba de diagnóstico complementario a la prueba tuberculínica que coadyuve al avance de las campañas zoonosanitarias contra la Tuberculosis bovina, que pueda realizarse en un alto número de laboratorios de diagnóstico, con un mínimo de inversión en cuanto a la adquisición de equipo y capacitación de personal, aplicando técnicas de fácil manejo, con resultados confiables y reproducibles, que procesen varias muestras a bajo costo y en corto tiempo. Como resultado de este planteamiento se propone el desarrollo y aplicación de la Técnica de Inmunoperoxidasa, empleando como antígeno PPD bovino, cuya ventaja ha quedado manifiesta en los trabajos que usan la prueba de ELISA. La aplicación de esta técnica debe resultar atractiva al ganadero, ya que con una adecuada orientación y manejo de los hatos se logra mejorar la productividad en las explotaciones y se avanza en la Campañas Zoonosanitarias contra la Tuberculosis.(19,22,23)

III. GENERALIDADES

1. ANTECEDENTES.- La Tuberculosis es una enfermedad que se conoce desde hace siglos y fue hasta 1882 cuando Robert Koch aisló el bacilo tuberculoso humano: Su trabajo sobre este microorganismo constituyó una impresionante confirmación de los criterios que el había señalado como necesarios para considerar una bacteria como agente etiológico de una enfermedad infecciosa. (7)

2. AGENTE ETIOLOGICO .-Los microorganismos de la tuberculosis que afectan a los mamíferos son *Mycobacterium tuberculosis* (el principal causante de la tuberculosis humana) *M. bovis* (Tuberculosis bovina) y *M. africanum* (Tuberculosis humana en Africa tropical). Está última especie tiene características intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Morfología.-El género *Mycobacterium*, está compuesto de microorganismos en forma de bastón (micobacterias) que raramente tiene ramificaciones en condiciones comunes de cultivo, los cuales resultan muy difíciles de teñir para observarlos en tejidos. Está caracterizado por su propiedad tintorial única de ácido - alcohol resistencia, con el método de Ziehl Neelsen. Los ácidos micólicos principalmente permiten retener intensamente colorantes básicos, como la fucsina fenicada, y resistir la decoloración con ácidos débiles y alcohol. (9)

3. COMPOSICION QUIMICA: La característica química más importante de las micobacterias es su alto contenido en lípidos, con cantidades que oscilan entre el 20 y 40% de su peso seco. (60% en la pared celular) lo que

explica el carácter hidrófobo de los microorganismos, que se muestra por una tendencia a adherirse a los otros durante el crecimiento en medios acuosos y a flotar en la superficie a pesar de añadir al medio detergente que facilita la dispersión. (2,7)

La cantidad de lípidos en la pared celular, puede explicar algunas de las propiedades características de las micobacterias, por ejemplo: la relativa impermeabilidad a los colorantes, la resistencia a la acción letal de los ácidos y la resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos y el complemento. A diferencia de la mayor parte de las bacterias patógenas que son aerobias y anaerobias facultativas, el bacilo tuberculoso es aerobio estricto, y muestra una sensible preferencia nutricional por los lípidos de la yema de huevo, que es un constituyente de los medios enriquecidos utilizados para su aislamiento, en los medios líquidos sintéticos el bacilo crece en grupos adherentes, que originan la formación de una película en la superficie, para descontaminar la muestra, se utiliza un método de tratamiento de ácido alcali, la muestra se coloca en una solución antiséptica de hipoclorito de sodio, se transfiere a una solución de ácido clorhídrico, se neutraliza con hidróxido de sodio y se siembra en el medio. El crecimiento es lento, tanto en medios de cultivo, como en animales, el tiempo de generación más corto observado en medios enriquecidos es de 12 horas, y el más largo sería de 36 horas aproximadamente.(7,8,9)

4. COMPOSICION ANTIGENICA.-Se han detectado por lo menos 30 antígenos distintos, algunos de estos son específicos de especie.

Los antígenos específicos son identificados mediante reacciones de aglutinación y pruebas cutáneas en cobayos empleando proteínas parcialmente purificadas (PPD procedentes de micobacterias distintas).(12,25)

5. RESISTENCIA AMBIENTAL.- *Mycobacterium bovis* es una bacteria moderadamente resistente al calor, a la desecación y a muchos desinfectantes (las características hidrófobas de su superficie impiden la fijación y penetración del desinfectante). En suelos ácidos, aumenta la supervivencia del bacilo, por lo que es beneficioso adicionar cal a estos suelos para incrementar su alcalinidad. Es destruido por acción de la luz solar directa, y la resiste cuando se encuentra rodeado de humedad. En ambientes templados, húmedos y protegidos (sombreados), puede permanecer viable durante algunas semanas e incluso meses. Como ejemplo citamos su permanencia en heces hasta 5 meses en invierno, 4 meses en otoño y 2 meses en verano. La supervivencia del bacilo tuberculoso en las heces es de 178 días, mientras que en la hierba está limitada a 49 días.

6. PATOGENIA.- El principal agente etiológico para los bovinos es *Mycobacterium bovis*, el bacilo tuberculoso penetra en el organismo principalmente por vía aerógena, la forma clínica y patológica más común es la tuberculosis pulmonar. El agente causal al penetrar en los pulmones y multiplicarse, forma un foco primario, que está acompañado de una lesión tuberculosa de los ganglios bronquiales del mismo lado, y de esta manera se crea el complejo primario. Estas lesiones pueden permanecer latentes o progresar, de acuerdo con la relación binomio agente infeccioso-huésped. Si baja la resistencia del animal frente al bacilo tuberculoso, la infección puede

difundirse a otros órganos por vía linfohemática o por los conductos naturales, con una generalización temprana. (21).

Cuando el sistema inmunocompetente es incapaz de destruir los bacilos, estos formarán tubérculos en los lugares donde se ubican. Los focos nuevos se sitúan principalmente en pulmones, riñones, hígado, bazo y en los ganglios correspondientes. La generalización también puede dar lugar a una tuberculosis miliar aguda. (21)

La mayoría de las veces, la tuberculosis tiene un curso crónico y limitado a un solo órgano, el pulmón. El proceso es lento y puede ser clínicamente inaparente por largo tiempo; incluso cierto número de animales pueden pasar toda su vida útil sin sintomatología evidente, pero constituyendo una amenaza potencial para el resto del hato. Otra forma que se observa con cierta frecuencia en animales infectados, en países sin control de la enfermedad, es la tuberculosis perlécea, o sea la peritonitis o pleuresia tuberculosa. Se estima que el 5% de las vacas tuberculosas, sobre todo en casos avanzados, tienen lesiones del útero o metritis tuberculosas y que 1-2% presenta mastitis tuberculosa, esta forma clínica resulta importante no solo desde el punto de vista de la salud pública sino también como fuente de infección para los terneros que se amamantan con la leche de modo natural o artificial. En la tuberculosis adquirida por vía bucal, uno de los signos principales consiste en la tumefacción de los ganglios retrofaringeos. En los terneros, la lesión primaria suele asentarse en los ganglios mesentéricos, sin que esté afectada la mucosa intestinal. La enfermedad es más frecuente a medida que avanza la edad del animal, debido al carácter crónico de la misma y al hecho de que con el transcurso del tiempo hay más oportunidades de que los animales estén expuestos a la infección. (6,20,21)

La prevalencia de esta es más alta en vacas lecheras que en animales de carne, porque su vida económica útil es más prolongada, y debido al mayor contacto al momento del ordeño, a la estabulación o semiestabulación.

Tuberculosis secundaria o postprimaria: Sucede en animales previamente sensibilizados, que sufren una segunda infección de origen exógeno o endógeno, siendo esta última más frecuente. Después de un periodo mayor de 10 días, se desarrolla una hipersensibilidad retardada (tipo IV) como consecuencia de una incapacidad de los macrófagos para la destrucción del bacilo tuberculoso que produce una excesiva secreción de linfocinas a partir de los linfocitos T, respondiendo a una segunda infección que con frecuencia es una reactivación tardía de un complejo primario. (2,10)

Estas sustancias ocasionan quimiotaxis (atracción), proliferación y activación de los macrófagos, produciéndose una reacción inflamatoria y como consecuencia de este se produce un tejido de granulación que presenta un tejido fibroso periférico y la presencia de linfocitos adyacentes a los vasos sanguíneos. (1,2,10)

6.1 Vías de eliminación: Los bacilos son eliminados con más frecuencia a través del aire expirado y esputo y por esta razón los pulmones son los órganos que con más frecuencia exhiben lesiones tuberculosas. También son eliminados en las heces, leche, orina, descargas vaginales, uterinas, seminales y a partir de nódulos linfáticos supurantes, en todo caso, lo que depende de la localización de las lesiones.(24)

7. INMUNIDAD. La respuesta inmune adquirida por infección o inmunización activa, es de tipo celular, mas que humoral, generalmente estimula la producción de linfocitos T sensibilizados, específicamente contra

antígenos de la bacteria. A una post exposición del microorganismo estas células proliferan y secretan linfocinas, las cuales, entre otras propiedades tienen la capacidad de activar a los macrófagos, quienes fagocitan al *Mycobacterium bovis*, pero este se reproduce intracelularmente. Los macrófagos de animales tuberculosos destruyen a las micobacterias más eficazmente y la especificidad se pierde ya que pueden actuar contra otras bacterias, como *Listeria spp* o *Brucella spp*. La respuesta inmune humoral del animal a la presencia de bacilos tuberculosos, esta indicada por la aparición de aglutininas, precipitinas, opsoninas y anticuerpos fijadores de complemento en el suero. Esta no es marcada y los títulos de anticuerpos son bajos. La respuesta humoral, no es de mucho interés para la protección contra la infección, ya que la inmunidad mediada por células, es más eficaz y en consecuencia más directa contra ciertos componentes de la bacteria. La reacción celular amplificada conocida como hipersensibilidad esta asociada con la protección contra la infección.(15,16,17)

La reacción de hipersensibilidad es lenta y tiene valor en el diagnóstico, ya que cuando se aplica tuberculina a las 72 horas, se presenta una reacción inflamatoria en el sitio de la aplicación que es proporcional al grado de infección o avance de la enfermedad. (24,26)

8. TRATAMIENTO: Desafortunadamente los resultados obtenidos a la fecha, no han justificado el empleo de quimioterapia específica , como una forma práctica de erradicar la tuberculosis en el ganado. (21)

9. CONTROL.-En los países industrializados, la Tuberculosis bovina, está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de control, mientras que en la

mayoría de los países en desarrollo la situación no ha mejorado o la prevalencia se encuentra en aumento. (20)

En casi todos los países de Europa occidental, la prevalencia de la infección bovina es inferior al 0.1%. En el hemisferio occidental, Canadá y los Estados Unidos de América han reducido la tasa de infección a niveles muy bajos. En América Latina, solo Cuba y Venezuela tienen programas de control de cobertura nacional. En varios países de Centro América y del Caribe, la tasa de infección es muy baja. Las tasas más altas de infección se encuentran en las cuencas lecheras, alrededor de las grandes ciudades de América del Sur. La Tuberculosis bovina es importante no solo porque constituye una fuente de infección humana, sino también por las pérdidas económicas que ocasiona. En el hombre, la prevención de la infección por *M. bovis* radica en la pasteurización de la leche y en la vacunación con BCG, así como en el control y erradicación de la Tuberculosis bovina. Las campañas de erradicación se basan sobre todo en la realización de pruebas tuberculinicas repetidas, hasta eliminar por completo los animales infectados de un rebaño.(5.20,21)

Aunque el factor determinante del inicio de los programas de control de la tuberculosis bovina fue un impacto sobre la salud pública, su importancia económica ha sido bien demostrada, ya que produce pérdidas directas, tanto en ganado lechero como en ganado de carne. (24)

Los programas de control y erradicación de la Tuberculosis bovina en los países desarrollados, se basaron en el empleo de una herramienta fundamental: la tuberculina "vieja de Koch", que usaron para el diagnóstico, basandose en el seguimiento y eliminación de reactores, esta herramienta se reemplazó por el **Derivado Proteico Purificado (PPD)**,

ganando sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, y a su vez, esta prueba tuberculínica incrementó la especificidad mediante el empleo de los PPDs bovino y aviar en la prueba Cervical Doble Comparativa. (6)

Muchos países del mundo en desarrollo se plantean actualmente controlar y erradicar la tuberculosis bovina, simultáneamente con acciones contra otras enfermedades del ganado que constituyen una traba para el desarrollo de su ganadería. Esto sucede en una etapa histórica en la que la tecnología puede proveer nuevos métodos de control. En México se alcanzó un avance importante con la creación de la CANETB (Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis), creado por la SAGAR (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural) la cuál contempla en sus distintas fases muestrear el 100% de ganado en el territorio nacional en un período de cinco años, instrumentar Comités de Campaña en cada entidad; consolidar el sistema de vigilancia, inspección y diagnóstico (con la implementación y refuerzo de laboratorios de diagnóstico especializado, estaciones cuarentenarias y casetas de inspección y verificación).A raíz de reuniones entre autoridades y productores para abordar el problema de la Tuberculosis, varios estados han declarado de interés público las campañas para atacar las referidas enfermedades, lo cual ha reforzado que las campañas sean obligatorias y permanentes.(5,6,9,21,24)

10. SALUD PUBLICA: Al hablar de la tuberculosis humana de origen animal, la identificamos con la producida por *Mycobacterium tuberculosis*, sin dejar de considerar la ocasionada por *Mycobacterium bovis*. (19)

Aunque la transmisión interhumana es posible se considera excepcional. Por el contrario, está probada la preponderante intervención de las fuentes animales en el contagio del hombre, la vía de infección depende de los hábitos alimenticios, de higiene y de la ocupación profesional con leche cruda y de que no toda la que se consume es higienizada. La ingestión de leche contaminada constituye una fuente de infección para el hombre. Esta vía de eliminación es de especial peligro para el hombre, ya que puede existir eliminación del bacilo sin que exista alteración en el aspecto externo de la leche. (21)

En zonas de América Latina donde la leche se consume hervida, esta vía de infección ha sido restringida; no obstante, si la prevalencia de la tuberculosis en el ganado bovino de la zona es elevada, la infección humana persiste como consecuencia de la preparación de subproductos (crema, mantequilla, queso etc.) con leche cruda y de que no toda la que se consume es higienizada. Además en estas áreas la vía aerógena es predominante.(2,10,19,21,24)

11. METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Los métodos de diagnóstico pueden ser directos o indirectos. Los primeros son los que determinan la presencia del agente etiológico en el organismo de sus componentes o productos derivados a través de la bacteriología y la histopatología. Los indirectos por medio de Pruebas Inmunológicas, por ejemplo: la prueba intradérmica, la prueba de gamma interferón (IFN) o las

pruebas serológicas aplicando las técnicas de ELISA o Inmunoperoxidasa , entre otras. (5,13,14)

11.1 METODOS DIRECTOS:

11.1.1 Diagnóstico Bacteriológico:

Es necesario sumergir tejidos en solución saturada de borato de sodio, esta solución inhibe el crecimiento de microorganismos contaminados y preserva la viabilidad de las micobacterias, si se trata de ganglios aparentemente afectados, se deberán enviar completos sin grasa y si se trata de otro tejido se deberá seleccionar la posible lesión enviando muestras de aproximadamente 1.0 cm³. El tiempo máximo que podrá permanecer el tejido en la solución de borato de sodio es de 4 semanas ya que en estas condiciones con el tiempo se va perdiendo la viabilidad de las micobacterias.

- **Por observación directa**, mediante la tinción de Ziehl Neelsen para microorganismos ácido - alcohol resistente en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse microscopia de fluorescencia, mediante la tinción con auramina - rodamina o auramina-fenol que tiñen a la bacteria de color verde limón brillante.
- **Por cultivo bacteriológico**, aislamiento e identificación de *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios de cultivo especiales como Stonebrink y Lowenstein Jensen obteniendo el crecimiento de 30 a 45 días aproximadamente.

11.1.2 Diagnóstico histopatológico:

Las muestras con lesiones sugestivas a tuberculosis, deberán fijarse con solución amortiguada de formol al 10.0 %, el tamaño de las mismas deberá ser de aproximadamente 1.0 cm³ y en una proporción de una parte de tejido y nueve de formol.

- Se deberá utilizar la tinción hematoxilina-eosina. Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de granulomas.
- Mediante la tinción de Ziehl Neelsen en frotis realizados con el material sospechoso.(1,6,19)

11.2 METODOS INDIRECTOS:

Estos determinan la respuesta del huésped al agente etiológico. Esta respuesta puede ser humoral (producción de anticuerpos circulantes), o celular, tal como la alergia tuberculínica o la liberación de gamma interferón por parte de los linfocitos en presencia de tuberculina. (6)

11.2.1 Prueba intradérmica, con el empleo de la tuberculina tipo derivado proteínico purificado (PPD). La reacción es específica mediada por células. Se desarrolla en dos etapas, los linfocitos T circulantes sensibilizados, encuentran primero al antígeno inyectado, y responden haciendo que las células cebadas vecinas se degranulen y liberen factores vasoactivos como la serotonina. (21)

El aumento en la permeabilidad y la apertura de los espacios entre las células endoteliales de los capilares permiten que más linfocitos T emigren desde la sangre al interior de los tejidos. En la segunda etapa de la reacción, estos linfocitos T que emigraron encuentran a los antígenos que les presentan las células de Langerhans; se dividen, diferencian y liberan linfocinas. Los macrófagos se acumulan en el lugar, debido a la liberación de factores quimiotácticos, su migración se inhibe por la acción de factores inhibidores. La reacción alcanza su máxima intensidad entre 24 y 72 horas después de la inyección y puede persistir durante varias semanas y desaparecer gradualmente. En las reacciones muy graves, puede aparecer necrosis en el lugar de la reacción. (1)

El método de prueba tuberculínica no debe considerarse como única prueba en la vigilancia epizootiológica. El desarrollo tecnológico aporta actualmente nuevas posibilidades al diagnóstico, que deben tenerse en cuenta y evaluar su utilidad en cada situación concreta. (6)

Actualmente se hallan en la etapa experimental o de evaluación, algunas pruebas in vitro que podrían, una vez determinada su eficacia y operatividad en condiciones de campo, emplearse como pruebas complementarias a la tuberculínica, ya sea para vigilancia epizootiológica o para confirmación diagnóstica. (6)

El uso de pruebas "en serie" aumenta la especificidad final del diagnóstico al ir seleccionando cada prueba a una población con mayor prevalencia que la anterior. (1,6,21)

Por lo tanto, contar con una "batería" de pruebas diagnósticas, utilizadas con buen criterio puede resultar muy beneficios para los programas de control.

11.2.2..Las pruebas *in vitro* propuestas actualmente son:

A.-Una prueba simple de "coagulación de sangre en presencia de glutaraldehído", en la que el tiempo de coagulación es menor cuando mayor es la concentración de inmunoglobulinas y fibrinógeno. De esta prueba existe aún muy escasa información sobre su eficacia.(19)

Los niveles elevados de IgG circulantes anti-*Mycobacterium*, tienen aparentemente buena correlación con la presencia de lesiones tuberculosas importantes y la existencia, por lo tanto, de gran cantidad de antígeno bacilar en el organismo. Los métodos que se basan en esta detección tienden a diagnosticar la enfermedad y no la infección con lesiones mínimas. Esto tendría aplicación en situaciones de prevalencia media o elevada, con gran difusión, donde en una primera etapa se podrían eliminar los animales con enfermedad avanzada, que son la principal fuente de infección en el hato.(12,14,19,22).

B.-Determinación de gamma interferón, liberado por los linfocitos en presencia de antígenos micobacterianos, recientemente perfeccionada mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, es un método *in vitro* que correlaciona muy bien con la infección tuberculosa. Las ventajas de estas pruebas con respecto a la tuberculina son especialmente operativas y sobre esa base ha sido adoptada en Australia. (3,20)

Los animales que han sido expuestos al *Mycobacterium bovis*, que han contraído una infección tiene linfocitos T en la sangre sensibilizados a los antígenos micobacterianos que se encuentran en el derivado de la proteína purificada (PPD) del *M. bovis*. En los animales infectados, se observa una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) *in vivo*, después de la administración de una inyección subcutánea del PPD del *M. bovis*. Esta respuesta DTH puede simularse *in vitro* si se exponen los linfocitos de los bovinos infectados al PPD de *M. bovis*. En respuesta a esta exposición, los linfocitos T sensibilizados producen gamma interferón, que puede detectarse con la prueba de IFN bovino. Los linfocitos provenientes de animales que no han estado expuestas a estos antígenos no producen gamma interferón. Por lo tanto, la detección de gamma interferón se correlaciona con una exposición al *M. bovis*.

Los resultados alcanzados detectan desde una infección incipiente hasta una tuberculosis activa, pero al igual que la prueba tuberculínica, no detectan un cierto porcentaje de animales enfermos, los anérgicos con tuberculosis diseminada. Estos métodos *in vitro* de detección de respuesta celular, tienen las mismas indicaciones que la prueba tuberculínica en un programa de erradicación. Pueden presentar sobre ella ventajas operacionales, ya que se realizan sobre una muestra de sangre, no requieren doble movilización y no interfieren con pruebas posteriores en el animal. (3.11.20)

C.-Las técnicas inmunoenzimáticas:

ELISA : (Enzyme-Linked immunosorbent Assay) se fundamentan en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente), la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrá ser fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar en la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro. Los ensayos inmunoenzimáticos se caracterizan de alta especificidad y baja sensibilidad para detectar la enfermedad tuberculosa. Detecta la presencia de inmunoglobulinas del tipo IgG₁ bovina, contra *Micobacterias* (respuesta inmune humoral) y, sus resultados positivos, se correlacionan con la presencia de lesiones tuberculosas microscópicas (enfermedad), pero no detectan infección incipiente, debido a su baja sensibilidad. Por tanto pueden aplicarse selectivamente para disminuir la prevalencia de tuberculosis en ganado lechero o estabulado, mediante la detección y eliminación de los animales enfermos. (.23).

TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA: La prueba indirecta de inmunoperoxidasa implementada en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, está sustentada en los principios básicos de la prueba de ELISA (ensayo inmunoenzimático).Las técnicas de inmunoperoxidasa son basadas en el uso de la enzima peroxidasa (aislada

de la raíz de rábano) como marcador para demostrar antígenos o anticuerpos a los niveles celulares o subcelulares, estos métodos fueron originalmente propuestos por Avrameas (1969) y Nakane y Pierce (1966).

Esta se desarrolla directamente sobre microplacas de 96 pozos sensibilizadas con antígenos *Mycobacterium bovis*, que detectan IgG₁. Se les aplica sueros en prueba, controles positivos y negativos y la reacción antígeno- inmunoglobulina se revela por la adición de la proteína G conjugada con peroxidasa se fija la porción Fe de los anticuerpos y la reacción enzimática es evidente, al añadirse el sustrato que degradado por la enzima activa al indicador que tiñe de manera característica a los pozos contenidos de suero procedente de bovinos infectados (positivos).

La reacción química de la enzima peroxidasa sobre el sustrato da como resultado una molécula de agua y una de hidrógeno y al añadir el cromógeno este cede un electrón, lo que provoca que la reacción sea más intensa y se hace aparente con el viraje del color.

La prueba es cualitativa y de acuerdo a sus características de sensibilidad y especificidad es una opción relevante para seleccionar rápida y eficazmente sueros positivos y negativos a Acs específicos contra *Mycobacterium bovis*.(3,16,18,22,23)

IV. OBJETIVOS

Evaluar la Técnica de inmunoperoxidasa como prueba complementaria a la tuberculinica, aplicada al diagnóstico serológico de la Tuberculosis bovina, bajo el principio de fácil manejo y costo mínimo, de tal forma que coadyuve a mejorar la toma de decisiones para enviar a rastro animales reactores provenientes de explotaciones lecheras y para la detección de animales anérgicos a la prueba intradérmica.

V. MATERIAL Y METODOS

Esta es una prueba realizada en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) en la cuál se utilizó lo siguiente:

1. MATERIAL:

A) Microplacas

- Microplacas de poliestireno Costar de 96 pozos de fondo plano

B) Micropipetas:

- Micropipetas con graduación de 10 a 150 microlitros.
- Micropipetas múltiples de 8 canales con graduación variable de 20 a 200 microlitros.

C) Antígeno:

- Antígeno de *Mycobacterium bovis* (PPD bovino modificado) el cuál se obtuvo de PRONABIVE.

D) Soluciones:

- Solución de lavado, 5X (Ver apéndice 1).
- Solución diluyente, 5X (Ver apéndice 1).

E) Conjugado:

- Proteína G - peroxidasa (Ver apéndice 1).

F) Sustrato o Indicador:

- 3 amino 9 ethil carbazol. (AEC) (Sygma Inmunotes No.5 1991 Inmunoperoxidase Substrates)(Ver apéndice 1).

G) Sueros:

- Sueros control: positivo y negativo anti *M. bovis* proporcionados por PRONABIVE
- 50 muestras de suero de origen bovino de hatos libres de tuberculosis bovina.
- 325 muestras de suero de origen bovino de hatos con incidencia de tuberculosis bovina, que se distribuyeron en cinco grupos al azar, en base a la procedencia y al tipo de prueba tuberculínica que se aplicó a los animales

En el cuadro No.1 aparece la distribución de estos grupos:

Cuadro N° 1
Procedencia de muestras de suero y tipo de prueba tuberculínica
aplicada.

Estado (grupo)	Pba. aplicada.	raza.	explotación	muestras	positivos	negativos
Sonora (I)	caudal	Charoláis	carne	123	34	89
Coahuila (II)	caudal	Holstein	leche	45	45	0
Puebla (III)	caudal	Holstein	leche	32	32	0
Subtotal caudal				200	111	89

Sonora (IV)	doble	Holstein	leche	125	62	63
B. Cal. (V)*	doble	Holstein	leche	50	0	50
subtotal doble				175	62	113

Total caudal/doble				375	173	202
--------------------	--	--	--	-----	-----	-----

* Control negativo, con más de 5 años de no presentar reactores a la tuberculina en el hato.

Los sueros de los grupos I, II y III pertenecen a 200 bovinos que se les practicó la prueba caudal provenientes de los estados de Sonora, Coahuila y

Puebla respectivamente, presentando un 55.5% de reactivos. El grupo IV, se formó con 125 sueros de animales sometidos a la prueba cervical doble comparativa procedentes del estado de Sonora, con una incidencia de 49.6%; finalmente el grupo V, quedó como control negativo empleando 50 sueros de bovinos ubicados en Mexicali, Baja California procedentes de un rancho que en los últimos 5 años no ha presentado reactivos a la tuberculina, en estos animales se repitió la prueba doble comparativa, encontrando 0.0% de reactivos.(3,12,23)

2. METODOS

Los 375 sueros se sometieron a la prueba de Inmunoperoxidasa (PIP).

A continuación se describe la técnica usada :

Se emplearon las microplacas de fondo plano previamente sensibilizadas con el antígeno , *Mycobacterium bovis* (PPD bovino modificado PRONABIVE) distribuyéndolo como se indica en la Figura 1.

Figura 1

Microplaca de fondo plano sensibilizada

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
B	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
C	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
D	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
E	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
F	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
G	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
H	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-

* Pozos contenidos de antígeno de *Mycobacterium bovis*

(Columnas 1,2,4,5,7,8,10,11)

- Pozos contenidos de diluyente, sin antígeno

(Columnas 3,6,9,12)

Desarrollo de la Prueba Indirecta de Inmunoperoxidasa:

1. Lavar las placas con solución de lavado, (ver apéndice 1) cuidando que todos los pozos se saturen con dicha solución, secarlas, primero eliminando la solución de lavado y enseguida escurriéndola cuantas veces sea necesario sobre una gasa limpia.
2. Adicionar 50 microlitros de solución diluyente en cada uno del total de los pozos.
3. A continuación se agregan 50 microlitros del suero control positivo de *Mycobacterium bovis* en cada uno de los siguientes pozos A1, A2 y A3; en tanto que los controles negativos se adicionan en los pozos B1, B2, B3.
4. Se distribuye el mismo volumen de los sueros problema sin diluir, en el resto de los pozos, por ejemplo:
 - Problema 1, adicionar en los pozos C1, C2 y C3.
 - Problema 2, Adicionar en los pozos D1, D2 y D3 y así sucesivamente hasta completar el último problema en los pozos, H10, H11 y H12.
5. Una vez que se colocó el total de sueros en la Microplaca, esta se incuba a 37°C, por espacio de 60 minutos.
6. Lavar las placas como se indica en el punto número 1.
7. Distribuir 50 microlitros de proteína G - peroxidasa, en cada uno del total de los pozos. La microplaca se incuba a 37°C, por espacio de 60 minutos.

8. Repetir el paso del inciso número 1 y 6.
9. Adicionar 50 microlitros de 3 amino 9 ethil carbazol sustrato (AEC) (previamente preparado), en cada uno del total de los pozos. La microplaca se incuba a 37°C, por espacio de 20 a 30 minutos, hasta que aparezca un color café rojizo en los pozos que contiene antígeno, donde se coloco el suero control positivo (A1 y A2), el pozo A3 permanece igual que los B1, B2 y B3 del suero control negativo, ver adelante.(3,13,14)

INTERPRETACION:

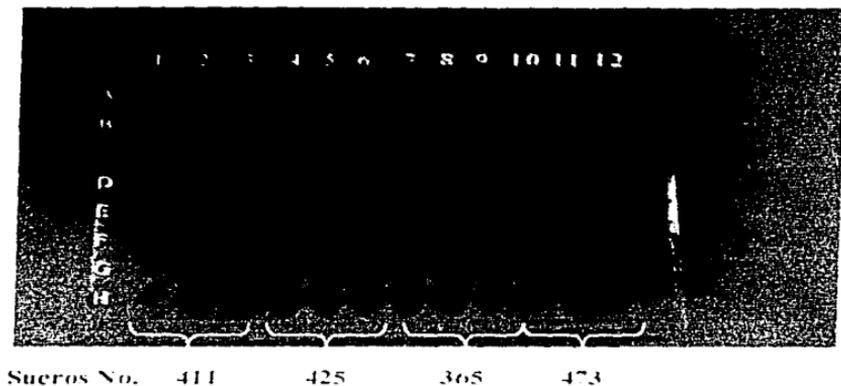
Para que la prueba sea válida los pozos (B1, B2 y B3) del suero control negativo permanecerán sin cambio (color rosa tenue).

Los sueros problema que presenten color café rojizo se consideran positivos. Aquellos que presenten el mismo color en el pozo que no contiene antígeno (columnas: 3, 6, 9 y 12), se considera que presentan reacción inespecífica y se repetirá el muestreo y prueba. De la misma manera aquellos sueros que presenten tanto reacción positiva como negativa para la misma muestra deberán repetirse.

En la figura No. 2 se muestra una placa sensibilizada, conteniendo el diluyente sin antígeno en las columnas (1,4,7,10) y el antígeno *Mycobacterium bovis* en las columnas (2,3,5,6,8,9,11,12). Se distribuyeron cuatro sueros (411,425,365,473) como se explica en la técnica.

Hubo reacción positiva de 2 sueros (411 y 473) de animales enfermos, en las columnas (2,3 y 11,12) del total de filas (A \Rightarrow H) donde los pozos se observan de color café rojizo y al centro la de los 2 sueros (425 y 365) de animales sanos con reacción negativa, los pozos permanecen sin color, en las columnas 5,6,y 8,9 de las filas (A \Rightarrow H).

FIGURA No. 2



De los animales de los grupos I y IV, el Comité para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis del Estado de Sonora, envió a sacrificio veinte bovinos, doce reactores a la prueba caudal del grupo I y ocho, del grupo IV reactores a la prueba doble comparativa, con el objeto de realizar estudios a la necropsia, histopatología y bacteriología. (3,13,15)

Aislamientos de *Mycobacterium spp* de 6 animales, se enviaron al Instituto Panamericano de Protección en Alimentos y Zoonosis (INPPAZ), para su tipificación. (ver Apéndice No.3)

En base a los resultados de histopatología y aislamiento bacteriológico se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunoperoxidasa, así como el valor predictivo de la prueba para animales positivos y negativos enfermos y sanos de tuberculosis bovina, respectivamente; aplicando la técnica de Tomas. K. (13, 25,26), en el apéndice 2, se muestran los cálculos.

VI. RESULTADOS

En el cuadro número 2 se presentan los resultados obtenidos con las muestras de sueros sometidos a la prueba de Inmunoperoxidasa, donde se observa que el grupo I (Sonora) II (Coahuila) y III (Puebla), presentaron 30, 20 y 5, positivos respectivamente. En suma en estos grupos se observaron 55 sueros positivos que equivalen a un 27.5%.

Los sueros de los animales del grupo IV (Sonora) presentaron 38 positivos que corresponde al 30.4%. Los sueros del grupo V (Baja California), considerados como control negativo no mostraron reacción positiva.

En el cuadro 3, aparecen los resultados de los 20 bovinos sacrificados donde se observa que de estos, 18 presentaron lesiones características de tuberculosis a la necropsia. Diez fueron positivos a la prueba histopatológica, mismos que resultaron positivos a la prueba de inmunoperoxidasa, de estos se obtuvieron 9 aislamientos, de los que se enviaron 6 a tipificar al INPPAZ, los 3 restantes no se enviaron por presentar contaminación. Se espera purificarlos para efectuar una adecuada identificación.

De las 6 muestras resultaron 4 positivos a *Mycobacterium bovis* y 2 a *Mycobacterium spp* atípicas. En el cuadro N° 3, aparece un resumen de los resultados previamente descritos, de las pruebas tuberculínica e Inmunoperoxidasa, así como, de las lesiones a la necropsia y pruebas de histopatología y bacteriología, en el apéndice 3 se anexan los resultados del INPPAZ.

Con respecto a los resultados de histopatología la prueba presentó una sensibilidad y especificidad de 100%, en tanto que con relación al aislamiento bacteriológico la sensibilidad corresponde a 100% y la especificidad de 90.9%. El valor predictivo en animales enfermos de tuberculosis bovina es de 90.9 a 100%, mientras que en animales sanos es de 100%. En el cuadro N° 4 se observan estos resultados y en el apéndice 2, los cálculos según la técnica de Tomas, K. (13)

Cuadro N° 2.
Resultados de la prueba de Inmunoperoxidasa.

Estado (grupo)	N° de muestras	positivos	negativos
Sonora (I)	123	30	93
Coahuila (II)	45	20	25
Puebla (III)	32	5	27
subtotal	200	55	145

Sonora (IV)	125	38	87
B. Cal. (V)	50	0	50
subtotal	175	38	137

Total	375	93	282
--------------	------------	-----------	------------

Cuadro N° 3.

Comparación de resultados entre las pruebas de tuberculina, inmunoperoxidasa, las lesiones a la necropsia y las pruebas de histopatología y bacteriología.

grupo	animales sacrificados	tuberculina		Inmuno- peroxidasa		lesiones		histopatología		bacteriología	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
I	12	11	1	4	8	12	0	4	8	3**	9
II	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
III	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
IV	8	8	0	6	2	6	2	6	2	6***	2
V	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
totales	20	19	1	10	10	18	2	10	10	9	11

* No se enviaron animales a rastro.

** No se enviaron a tipificar.

*** Se enviaron 6 muestras a tipificar al INPPAZ, resultando 4 positivas a *Mycobacterium bovis* y 2 a *Mycobacterias atípicas*.

CUADRO No. 4.

**SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO DE LA
PRUEBA DE
INMUNOPEROXIDASA.**

Con respecto a:	Sensibilidad.	Especificidad.	V. P. POSITIVOS. *	V. P. NEGATIVOS.*
HISTOPATOLOGÍA.	100%	100%	100%	100%
AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO.	100%	90.9%	90%	100%

*** V. P. = VALOR PREDICTIVO.**

VII. DISCUSION

La prueba intradérmica (tuberculina), es la principal herramienta en el diagnóstico de la Tuberculosis bovina y por ende en las campañas zoonosanitarias contra la enfermedad, sin embargo, presenta algunas limitantes sobre todo en hatos donde la incidencia es baja, ya que cuando se envían animales a sacrificio no se encuentran lesiones a la necropsia interpretandose como falsos positivos a la prueba de tuberculina esto se debe principalmente a la elevada sensibilidad de la prueba que no distingue entre animales sanos expuestos al *Mycobacterium bovis* que desarrollan una buena respuesta inmune y por lo tanto no presentan lesiones. Por otra parte animales susceptibles que manifiestan baja inmunidad, presentan la enfermedad con lesiones características. En este estudio la prueba intradérmica, se comportó conforme a lo anterior en la aplicación de la técnica anocaudal y en la doble comparativa se observa una mayor sensibilidad. (ver cuadro N° 3). Subrayandose que la prueba intradérmica detecta la respuesta inmunológica de animales enfermos y animales sanos que estuvieron expuestos al *M. bovis*.

En referencia a los resultados positivos (Cuadro No.2) de la prueba de Inmunoperoxidasa con respecto a la tuberculina caudal se observa una correlación de 49.5% y a la doble comparativa de 61.3%, lo que indica una menor sensibilidad de esta prueba para detectar animales expuestos al *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, presenta una sensibilidad y especificidad aceptables para diagnosticar animales enfermos (Ver cuadro 4).

La tuberculosis en los bovinos sugiere un comportamiento análogo al descrito por Mossman T, Scott P y Yamamura M; encontraron que la respuesta

inmune celular contra tuberculosis (tipo Th1) es orientada a la protección de los individuos expuestos y estos no desarrollan la enfermedad y por lo tanto tampoco signos característicos; en tanto que aquellos individuos que inducen una respuesta humoral (tipo Th2), no confieren protección como resultado de una ineficiente activación de los macrófagos. (4)

La respuesta inmunitaria celular, tipo Th1, se caracteriza porque las células que intervienen producen: interleucina 2, gamma interferón IFN y factor de necrosis tumoral, este último en conjunto con los macrófagos activados participan en la inflamación local que se induce con la aplicación de la tuberculina a animales inmunes, ya sea que se encuentren sanos o enfermos. (4)

Por otro lado, la respuesta humoral tipo Th2, se caracteriza porque las células que participan producen interleucinas 4, 5, 6 y 10; y los individuos generalmente sufren la enfermedad, produciendo títulos elevados de anticuerpos contra el bacilo tuberculoso. En este sentido es recomendable la aplicación de técnicas serológicas para el diagnóstico de tuberculosis en individuos enfermos y diferenciarlos de aquellos que estuvieron expuestos al bacilo tuberculoso y desarrollaron una respuesta inmune que los hace reactivos a la tuberculina o gamma interferón, que están protegidos y no sufren la enfermedad. (4)

Las pruebas inmunoenzimáticas, como la de ELISA han mostrado su utilidad para el diagnóstico serológico de bovinos tuberculosos (22), sin embargo en las condiciones de países en desarrollo resulta con desventajas ya que para su aplicación se requiere de personal altamente calificado, y equipo especializado (lector de ELISA) con un costo elevado, contra las ventajas que

ofrecen otras pruebas en este caso la de Inmunoperoxidasa, que no requiere de personal capacitado y equipo especializado que permite leer las reacciones e interpretar los resultados directamente.(3,14,18,22)

Considerando que la técnica de Inmunoperoxidasa (PIP) en este estudio presentó una buena sensibilidad y especificidad, así como, un elevado porcentaje del valor predictivo para detectar animales enfermos y sanos (Ver cuadro 4), es recomendable su uso como complemento a la prueba intradérmica (tuberculina), sobre todo, en hatos de bovinos destinados a la producción de leche, en virtud de que en los animales que resulten positivos a la PIP, presentan una deficiente respuesta inmune y son mas susceptibles a la tuberculosis, por lo que aumenta la probabilidad de observar lesiones características a la necropsia. En tanto, que los reactivos a la tuberculina, que resulten negativos a la PIP y que presenten un buen promedio de producción de leche, seguramente se encuentran protegidos y no padecen la enfermedad, por lo tanto, para evitar el sacrificio de "reactivos, falsos positivos a la tuberculina" no deberán enviarse a sacrificio al rastro.(3,14)

VIII. CONCLUSION

Se concluye que la técnica de Inmunoperoxidasa, presenta buena sensibilidad y especificidad para diagnosticar la tuberculosis bovina en animales que sufren estadios avanzados de la enfermedad, por lo que resulta de utilidad en el diagnóstico complementario de la Tuberculosis Bovina en hatos destinados a la producción de leche y que puede representar una herramienta útil para el avance de las campañas zoonosanitarias contra la enfermedad.

Este estudio se puede ampliar para confirmar los resultados obtenidos aquí, con un número mayor de animales enfermos, dando seguimiento a rastro, practicando la necropsia, realizando estudios de histopatología, intentando el aislamiento y tipificación de *Mycobacterium bovis*. Lo cuál sería también útil para evaluar la posibilidad de reacciones cruzadas dentro de la prueba de Inmunoperoxidasa.

En referencia a los resultados positivos, la prueba de Inmunoperoxidasa presentó una correlación con respecto a la tuberculina caudal de 49.5% y a la doble comparativa de 61.3%. La prueba de inmunoperoxidasa presenta una sensibilidad de 100% y una especificidad de 90.9 a 100%, en animales tuberculosos; por lo que puede usarse como prueba complementaria a la tuberculina sobre todo en hatos de bovinos destinados a la producción de leche, en virtud de que en aquellos que resulten positivos aumenta la probabilidad de encontrar lesiones a la necropsia y se puede evitar el envío a sacrificio de animales “falsos positivos a la tuberculina” que no sufren la enfermedad y presentan buena producción de leche.

En base a lo anterior se concluye que la técnica de Inmunoperoxidasa, es de utilidad en el diagnóstico complementario de la Tuberculosis Bovina y puede llegar a representar una herramienta útil para el avance de las campañas zoonosanitarias contra la enfermedad.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbas, K:A:, Lichtman, H:A: y Pobe S.J., **Inmunología Celular y Molecular**, la Edición, Editorial Mc. Graw Hill, Interamericana, 1995.
- 2.-Bob A. Freeman, **Textbook of Microbiology**, 15th Edition, Ed. Saunders Pags. 689-716, 1986.
- 3.-Bojorquez, N.L.,Gurría T:F:, Reyes S:A:, **Evaluación de una técnica de inmunoperoxidasa**, International Symposium on Bovine Tuberculosis in Animals and Human Beings, University of Maryland College Park, Maryland 20247 USA May 8-10, 1995.
- 4.-Cabrera C.R., Gómez L:P:, y Cravioto A, **Vacunas, fundamentos para su desarrollo** la Edición, Ed. Manual Moderno, México, D.F. 1996.
- 5.-Charles o. Thoen, James H. Steele; **Mycobaterium bovis Infection in Animals and Humans**, First Edition, Iowa State University Press/Ames, Pags. 190-201,1995.
- 6.-Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis SAGAR, **Manual de actualización técnica para la aprobación del médico veterinario en Tuberculosis bovina y brucelosis** , Pags. 17-27, 70-90, 1995.

7.-Davis Bernard D.,Dulbecco Renato, Eisen Hernana N.;**Tratado de Microbiología**,4a. Edición, Salvat Editores S.A., Pags.868-8891, 1987

8.- G:R: Carter, M:M: Chengappa. **Microbial diseases**; First Edition, Iowa State University Press/Ames , Pags. 48-50, 1993.

9.- Hagan and Bruner's, **Infection Diseases of Domestic Animals** 7th Edition, Pags. 247-263.

10.-Hull Thomas G, **Diseases transmitted from animal to man** Eight Edition, Ed. Saunders, Pags. 689-716, 1986.

11.-Idexx Innovators in Diagnostics, **Juego de prueba para el gamma interferon en respuesta al *Mycobacterium bovis***. Idexx Laboratories, Westbrook, Maine, 1993.

12.-J.P. Van Vooren, M. Turner, J:C. Yernault. J de Bruyn, **A multidot immunobinding assay for the serodiagnosis of tuberculosis**, Journal of Immunological Methods, Vol. 113, Pags. 43-49,1988

13.-K. Toman, **Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests**, Bulletin of the International Union Against Tuberculosis, Vol. 56 Pags. 18-28, 1984

- 14.- L:A: Auer, **Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis***, Australian Veterinary Journal , Vol. 64 Pags. 172-176, 1987.
- 15.-Leslie Hudson, Frank C. Hay, **Practical Immunology**, 3th. Edition, Black Well Scientific Publications Pags. 264-270, 1993
- 16.- Lucia Barrera, Isabel Miceli, Viviana Rittacco, Gabriela Torrea, Beatriz Broglia, **Detection of circulating antibodies to purified protein derivative by enzyme linked immunosorbent assay its, potencial for the rapid diagnostics of tuberculosis**. *Pediatr Infect Disease* Vol. 8 No.11 Pags. 763-767, 1989.
- 17.- Lucia Barrera, Viviana Ritacco, C. Eisele, J. Paleschi, A Monteverde, Gabriela Torrea, R. Negroni, E Padula, **Evaluación del inmunoensayo para el diagnóstico rápido de tuberculosis paucibacilar del adulto**. *Medicina* Buenos Aires, Vol. 49 Pags. 561-566, 1989.
- 18.-Morten Harboe, Harald G. Wikwr, J. Robert Duncan, Manuel M. Garcia, **Protein g based enzyme linked immunosorbent assay for anti mpb70 antibodies in bovine tuberculosis**, *Journal of Clinical Microbiology*, Pags 913-921, 1990
- 19.- Organización Panamericana de la Salud, OMS. **Elementos para la elaboración de un plan de acción para la erradicación de la Tuberculosis**

bovina, Programa de la Salud Pública Veterinaria, Saltillo, Coahuila, México, Pags 5-15,1991.

20.-Office of the Federal Register National Archives and Records Administration Special Edition, **Code of Federal Regulations; The National Archives of the United States**, Pags. 482 -484, 1987.

21.-Pedro N. Acha, Boris Szifres, **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** 2a Reimpresión, Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica No. 503 Pags. 174-185, 1992.

22.-Rittaco V, López B. Barrera, L. Nader, A Flisser, E & Kantor . **Further evaluation of an indirect enzyme- linked immunosorbent assay for the diagnostic of bovine tuberculosis**. Journal Veterinary, B 37, Pag. 19-27, 1990.

23.- Ruiz N:A. López Q.L., Gallegos G.R.M. Bojórquez N.L., **Métodos alternos para el diagnóstico de enfermedades de los bovinos , sencillos , prácticos y económicos**, XVII Congreso Nacional de Buiatría, Villahermosa Tabasco, 1992.

24.-Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural , Norma Oficial Mexicana NOM-031-Z00 1995 **Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*)** , Diario Oficial, Marzo 1996.

25.- V. Rittaco, B. López I:N: Kantor, L. Barrera, F. Errico **Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis**, Research in Veterinary Vol. 50, Pags. 365-367,1991.

26.- V.Rittaco, B. López, L.Barrera, G. Torrea, A. Nader, I:N: Kantor, E: Fliess, **Evaluación de cuatro antígenos para la detección de antígeno-*Mycobacterium bovis* por enzimmunoensayo**, Revista Argentina de Microbiología, Vol. 20 Pags. 98-101

X. APÉNDICE I

PREPARACION DE SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASAS:

- **Solución de lavado, 5X :**

Preparar por separado las soluciones I y II

Solución I

Cloruro de sodio (NaCl)----- 40.0 g

Cloruro de potasio (KCl)----- 1.0

Agua destilada, c. b. p.----- 500.0 ml

La solución se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

Solución II

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)----- 5.75 g

Fosfato de potasio monobásico (KH_2HPO_4)----- 1.00 g

Agua destilada, c. b. p.----- 500.0 ml

La solución se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

Formular la solución de lavado 5X a 4 °C:

Solución I ----- 500.00 ml

Solución II ----- 500.00 ml

Albúmina sérica bovina frac. V (10% m/v)-- 10.00 ml

Tween 20 ----- 2.50 ml

Solución de timerosal (1.1% m/v) ----- 5.00 ml

Esta se envasa en frascos de 57 ml con un volumen de 51 ml en forma estéril, se etiqueta identificando la solución y se mantiene a 4 °C hasta su utilización.

Por cada microplaca que se emplee, la solución de lavado 5X se diluye con agua destilada como a continuación se indica:

Solución de lavado 5x ----- 14.4 ml

Agua destilada ----- 57.6 ml

Volumen total ----- 72.0 ml.

• **Solución diluyente, 5X:**

Preparar por separado las soluciones I y II

Solución I

Cloruro de sodio (NaCl)----- 145.0 g

Cloruro de potasio (KCl)----- 1.0

Agua destilada, c. b. p.----- 500.0 ml

La solución se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

Solución II

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)----- 5.75 g

Fosfato de potasio monobásico (KH_2HPO_4)----- 1.00 g

Agua destilada, c. b. p.----- 500.0 ml

La solución se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

Formular la solución de lavado 5X a 4 °C:

Solución I ----- 500.00 ml

Solución II ----- 500.00 ml

Albúmina sérica bovina frac. V (10% m/v)-- 10.00 ml

Tween 20 ----- 2.50 ml

Solución de timerosal (11.0% m/v) estéril---- 5.00 ml

Esta se envasa en frascos de 57 ml con un volumen de 34.5 ml en forma estéril, se etiqueta identificando la solución y se mantiene a 4 °C hasta su utilización.

Por cada microplaca que se emplee, la solución de lavado 5X se diluye con agua destilada como a continuación se indica

Solución de lavado 5x -----	3.4 ml
Agua destilada -----	13.6 ml
Volumen total -----	17.0 ml

- **Proteína G - peroxidasa.**

La proteína G-Peroxidasa, que se fija fuertemente a la fracción Fc de la **IgG₁** bovina, (se uso de la marca **Zymed**, que es una proteína G recombinante, clonado de ***Streptococcus spp. gx7809*** y producido por ***E. coli***, acoplado a la peroxidasa).(HRP-rec- Protein G. Cat. 210-1223 MCA Zymed) La presentación de 5.0 ml se fracciona en volúmenes de 0.2 ml y se envasa en frascos de 3.0 ml, se mantiene a 4°C hasta su utilización.

Por cada microplaca que se emplee, la Proteína G peroxidasa se diluye con agua destilada como a continuación se indica:

Proteína G peroxidasa -----	0.015 ml (15.0 microlitros)
------------------------------------	------------------------------------

Agua destilada ----- 7.485 ml

Volumen total ----- 7.500 ml.

• **3 amino 9 ethil carbazol. Sustrato e indicador.**

Preparar por separado las soluciones A y B, así como, la solución del sustrato:

Solución A para sustrato

Acido cítrico ----- 19.2 g

Agua destilada, c. b. p.----- 1,000.0 ml

La solución se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. Esta se envasa en frascos de 57 ml con un volumen de 51.0 ml en forma estéril, se etiqueta identificando la solución y se mantiene a temperatura ambiente hasta su utilización.

Solución B para sustrato

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)----- 28.40 g

Agua destilada, c. b. p.----- 1,000.0 ml

Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 μ , adicionar 1.0 ml de solución estéril de timerosal al 11.0% . Esta se envasa en frascos de 57 ml con

un volumen de 51.0 ml en forma estéril, se etiqueta identificando la solución y se mantiene a temperatura ambiente hasta su utilización.

Indicador de peroxidasa:

3 amino- 9 ethil- carbazol ----- 5.00 g

Alcohol etílico ----- 25.00 ml

Tween 20 ----- 75.00 ml

Se macera finamente el 3 amino- 9 ethil- carbazol en un mortero de porcelana y se adiciona lentamente el alcohol hasta su disolución, después el tween 20. Se envasa en fracciones de 2.1 ml en frascos de 3.0 ml, se etiqueta y mantiene a 4°C, hasta su uso.

Solución de sustrato (peróxido de hidrogeno)

Se envasa en frascos de 3 ml con un volumen de 0.15 ml en forma estéril, se etiqueta identificando la solución y se mantiene a 4 °C hasta su utilización.

Por cada microplaca que se emplee, preparar la solución de sustrato e indicador de peroxidasa como a continuación se indica:

Solución A ----- 5.00 ml

Solución B ----- 5.00 ml

Indicador de peroxidasa ----- 0.20 ml

Sustrato de peroxidasa (H_2O_2)----- 0.01 ml (10 microlitros)

Volumen total ----- 10.21 ml.

APÉNDICE 2.

CALCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA CON RESPECTO A HISTOPATOLOGÍA:

ENFERMEDAD			
ENSAYO:	PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
	a	b	a + b
POSITIVO	10	0	10
	c	d	c + d
NEGATIVO	0	10	10
	a + c	b + d	a+b+c+d
TOTAL	10	10	20

$$S = (a/a + c) \times 100$$

$$Sp = (d/d + c) \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = (10/10 + 0) \times 100 = 100\%.$$

$$\text{Especificidad} = (10/10$$

$$+ 0) \times 100 = 100\%.$$

$$\text{Valor predictivo (positivos)} = (a/a+b) \times 100 = 10/10 \times 100 = 100\%.$$

$$\text{Valor predictivo (negativos)} = (a/a+b) \times 100 = 10/10 \times 100 = 100\%.$$

APÉNDICE 2.

CALCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA CON RESPECTO AL AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO:

ENFERMEDAD			
ENSAYO:	PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
	a	b	a + b
POSITIVO	9	1	10
	c	d	c + d
NEGATIVO	0	10	10
	a + c	b + d	a+b+c+d
TOTAL	9	11	20

$$S = (a/a + c) \times 100$$

$$Sp = (d/d + c) \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = (9/9 + 0) \times 100 = 100\%.$$

$$\text{Especificidad} = (10/11 + 0) \times 100 = 90.9\%.$$

$$\text{Valor predictivo (positivos)} = (a/a+b) \times 100 = 9/10 \times 100 = 90\%.$$

$$\text{Valor predictivo (negativos)} = (d/d+b) \times 100 = 10/10 \times 100 = 100\%.$$

APÉNDICE 3.

Informe del Instituto Panamericano de Protección en Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) sobre resultados obtenidos en las pruebas de tipificación de seis cepas de *Mycobacterium spp* aisladas de animales reactivos a la tuberculina, positivos a la prueba de inmunoperoxidasa, a estudios de histopatología y con lesiones características de tuberculosis, en el estado de Sonora.



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD



Abril 21, 1995

PARA : ING. LUIS BOJORGUEZ

DE : DR. FORTUNATO VARGAS TERRYORI

ADJUNTO INFORME RECIBIDO DE INPPAZ SOBRE RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE 6 CEPAS MYCOBACTERIUM AISLADAS DE ANIMALES REACTORES A LA TUBERCULINA Y CON LECCIONES CARACTERISTICAS DE TBC., EN EL ESTADO DE SONORA. (PROBABIVE - COMISION NACIONAL PARA LA ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS Y TUBERCULOSIS BOVINA DE MEXICO).

CORDIALES SALUDOS


Con atentos saludos
de la OPS/OMS en México



INPAZ
INPAZ
 INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCION DE ALIMENTOS Y ZOOLOGIA

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD * ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
 PROGRAMA DE SALUD PUBLICA VETERINARIA

Ref:---

INFORME

Resultados Pruebas de Identificación de *Mycobacterium*

Genes Origen: Mycobacterium aisladas de Animales Reactores a la tuberculina

J-121, I 2771, J-7*, J-508, I 4409, J-270

Envía: PRONABIVE, Comisión Nacional para la Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis Bovina en México.

Fecha:

Pruebas Realizadas y Resultados Obtenidos

Pruebas	No. Cepas					
	J-121	I 2771	J 7*	J-508	I 4409	J-270
Crecim. Lowenstein	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Crecim. Stonebrink	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Asp. colonias	lisas	lisas	lisas	lisas	lisas	lisas
Tiempo desarrollo	7 días	>20 días	7 días	>20 días	>20 días	7 días
Pigmentación luz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Pigmentación oscura	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
β glucosidasa	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Pirazinamidasa	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Nitrato Reduct.	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Catalasa TA	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Catalasa 68 °C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Ureasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ziehl Neelsen	(+)BAAR	(+)BAAR	(+)BAAR	(+)BAAR	(+)BAAR	(+)BAAR

Sondas ADN (Acou Probe)

<i>M. tuberculosis</i> complex **	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>M. avium</i> complex	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)



INPPAZ

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD • ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
PROGRAMA DE SALUD PUBLICA VETERINARIA

Ref:

Conclusiones:

J-121: *Mycobacterium* sp. crecimiento rápido. Grupo IV Runyon. Caracteres coincidentes con complejo *M. fortuitum*.

I-2771: *Mycobacterium bovis* **

J-7*: De acuerdo a sonda ADN *M. tuberculosis* complex (incluye *M. bovis*). Los caracteres fenotipicos no concuerdan. Puede deberse a contaminación de un cultivo original de *M. bovis* o mezcla de cepas.

J-508: *Mycobacterium bovis* **

I-4409: *Mycobacterium bovis* **

J-270: Similares características a J72

La sonda genética reconoció presencia de ADN de Complejo *M. tuberculosis*. Sin embargo, los caracteres fenotipicos son de una cepa de rápido desarrollo coincidentes con complejo *M. fortuitum*. Posible contaminación y/o mezcla de cepas.

- * La identificación del cultivo era parcialmente legible.
- ** La sonda genética no diferencia dentro del Complejo *M. tuberculosis*. La conclusión de que el aislamiento es *M. bovis* se basa también en los caracteres fenotipicos que son diferenciales entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

El ADN de las cepas I-2771, J-508 e I-4409 será analizado por RFLP comparativamente a cepas *M. bovis* de otras procedencias. Los resultados le serán comunicados cuando estén disponibles.