

11674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA
SALUD ANIMAL

ASOCIACION DE LA EXCRECION DE *Mycobacterium
bovis* CON LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA EN
UN HATO DE ALTA PREVALENCIA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

AURORA ROMERO TEJEDA

TUTOR: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ

COMITE TUTORAL: DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO

DR. FELICIANO MILIAN SUAZO

COASESOR INVITADO: DR. CIRO ESTRADA CHAVEZ

MEXICO, D.F.

2003



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.

DEDICATORIA

A **DIOS** por permitirme existir y ser feliz cada día de mi existencia

A mis abuelos Carolina, Hermenegildo, Guillermina y Daniel' por ser la base de mi existencia

A mi padre Rafael Romero Díaz por hacerme seguir su constante ejemplo de lucha y superación y por darme las armas necesarias para luchar por mis sueños. Por estar siempre a mi lado con su amor de padre y por enseñarme a caminar siempre con la frente en alto a pesar de las adversidades. A ti te dedico todos y cada uno de mis logros. Te amo padre.

A mi madre Aurora Tejeda de Romero por enseñarme a vivir con alegría cada instante y por enseñarme que cada día se debe de enfrentar con fortaleza y cariño. Por ser mi mejor amiga, por contar siempre con su apoyo, su amor de madre, su ejemplo de lucha constante y por siempre tener sus brazos y corazón abiertos para mi. Te amo madre.

A mis hermanos Daniel y Rafael, por darle dulzura y fortaleza a mi vida y por darme la mano en los momentos difíciles. Gracias por su ejemplo de lucha y superación. Los amo.

A ese pequeño angelito' que nos regaló instantes de vida, pero que nos dejó una gran enseñanza de cariño y unión familiar para toda la vida.

Al pequeño Daniel, que con una pequeña sonrisa alegra el corazón entero. Espero algún día encontrarme en la lista de agradecimientos de tus futuros logros.

Al MVZ. Rafael Carbajal Aguilera' por contagiarme de esas ganas de aferrarme al conocimiento y por hacerme amar esta hermosa profesión.

A esos hermosos seres que me han enseñado que no es necesario hablar para poder derramar cariño en cada momento. Por permitirme aprender de ustedes y por ser parte de mi felicidad en esta vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas al conocimiento y por darme las herramientas para mi desarrollo profesional y personal.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por todas las facilidades que me ha brindado para ser mejor profesionista cada día.

Al rancho Almaraz (FES-C4) por abrirme sus puertas y brindarme el apoyo para mi formación.

Al CENID-Microbiología (INIFAP) por haberme permitido realizar la parte experimental de mi tesis.

A CONACyT por haberme otorgado el apoyo económico durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Camila Arriaga Díaz por su apoyo incondicional, su disposición, su amistad y su amabilidad constante en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Feliciano Milián Suazo por su paciencia y completa disposición para revisar y mejorar este trabajo de investigación. Por su valiosa amistad y por inculcarme el ser mejor profesionista día tras día.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por su valioso apoyo en este trabajo hasta el último momento y por las grandes enseñanzas que aportó a mi crecimiento como profesionista. Por siempre hacerme ver mis errores y hacerme aprender de ellos.

Al Dr. Ciro Estrada Chávez por su gran y total apoyo en la realización de este trabajo, además de ser parte importante de él. Por haberme inculcado las ganas de seguir siempre adelante y de ser mejor cada día. Por su paciencia y por todos sus valiosos conocimientos aportados para mi superación personal y profesional. Gracias por darme la mano y ayudarme en momentos difíciles en mi vida. Muchas gracias por tu valiosa amistad. Este logro también es tuyo.

A los integrantes de mi jurado, la Dra. Clara Espitia Pinzón y el Dr. Andrés Romero Rojas por su paciencia y amabilidad en la revisión de mi tesis, y por haber aportado importantes opiniones para mejorarlo.

Al MVZ Jesús Guevara Vivero por su total apoyo material y moral en la realización de este trabajo. Gracias por hacerme crecer como profesionista y aún más como persona. Muchas gracias por todo lo que me ha brindado y por siempre procurar lo mejor para mí. Además, gracias por su valiosa amistad la cual guardo con mucho cariño y respeto.

Al MVZ EPA. J. Alfredo García Salazar, por enseñarme mucho de lo que hoy sé y por ser parte importante de este proyecto. Gracias por estar siempre en los buenos y malos momentos, por darme siempre la mano cuantas veces me caí en el camino, por no dejarme despegar los pies del piso, por llevarme de la mano en caminos difíciles y por hacerme aprender de mis errores. Gracias por hacerme querer mi profesión día con día, por hacerme reforzar la fe en mi misma y por ser parte importante de mi vida. Muchos de mis logros y triunfos son tuyos también.

A la M en C. Cynthia González Ruiz por su apoyo en la realización de la parte de histopatología de este trabajo y por su valiosa amistad. Al pMVZ Rubén Torres y a la técnico Yolanda por su participación y apoyo en la realización del trabajo histopatológico.

A la MVZ Georgina Robles por su apoyo incondicional en la realización de la parte de aislamiento bacteriano.

A la MVZ Pamela Ibarra por su participación en parte de este proyecto de investigación.

Al M en C. Dionisio Córdoba por brindarme su desinteresado apoyo en el desarrollo de la parte estadística de mi trabajo.

A los M. en C. Alejandra Ayanegui y Hugo Ramírez por su amabilidad y apoyo en mis estudios de posgrado. Agradezco también a Mine por siempre estar cuando la necesité.

A mis grandes amigos que han compartido tristezas y alegrías conmigo: Alfredo, Oscar, Norma, Chucho y Reyna.

Al MVZ. Mario Vargas por siempre compartir sus conocimientos y por contagiarme de las ganas de aprender.

A todos mis compañeros y amigos que le dieron un toque y chispa especial a mi vida y a mi estancia en el laboratorio: Cecy, Mago, Martita, Omar, Mary, Feli, Carlos, Jorge, Blanca, Dr. Víctor Banda, Nora, Elvira, Lupita, Fernando, entre muchos más.

A todos los que colaboraron en algún momento con sus valiosas opiniones para mejorar mi trabajo: Dra. Gabriela Bárcenas y Dr. Andrés Romero

RESUMEN

Romero Tejeda Aurora. "Asociación de la excreción de *Mycobacterium bovis* con la respuesta inmune específica en un hato de alta prevalencia". Bajo la dirección de la Dra. Camila Arriaga Díaz, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Dr. Feliciano Milián Suazo y el Coasesor invitado: Dr. Ciro Estrada Chávez.

La tuberculosis bovina (TB) es considerada como un problema de salud pública y una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria ganadera. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la asociación existente entre la excreción bacteriana y la respuesta inmune específica medida por las pruebas de tuberculina, interferón gama (IFN- γ) y ELISA. Se emplearon 69 bovinos de la raza Holstein Friesian provenientes de un rancho con alta prevalencia de TB (Alamaraz, FESC-4), a los que se les realizaron las pruebas diagnósticas al inicio del experimento y posteriormente a los 6 meses. Mensualmente se tomó una muestra de exudado nasal de cada bovino durante un periodo de 6 meses, con la finalidad de detectar la presencia de ADN de *M. bovis* mediante una PCR anidada. Los animales positivos a la prueba de tuberculina se sacrificaron y se determinó la presencia de lesiones sugestivas de TB. Se identificaron 8 animales excretores mediante la PCR anidada, los cuales fueron positivos a las pruebas de tuberculina e IFN- γ y solo uno de ellos positivo a ELISA. Seis de los ocho animales excretores presentaron lesiones compatibles con TB en nódulos asociados al tracto respiratorio y sólo dos de los ocho las presentaron en pulmón. No se observaron lesiones en dos de los animales excretores. Los valores de Cohen's *kappa* obtenidos entre la excreción bacteriana y las pruebas inmunes fueron bajos, sin embargo las pruebas de IFN- γ y tuberculina mostraron una mayor concordancia (39 y 29% respectivamente) que la prueba de ELISA (4%), debido quizás a que la respuesta inmune celular y la hipersensibilidad tardía producen daño y necrosis tisular con la consecuente liberación de la bacteria por vía aerógena, sin olvidar los diversos factores epidemiológicos que pueden estar involucrados en su presentación. La presencia de animales excretores sin lesiones visibles sugiere que no se debe descartar la presencia de focos primarios a partir de los cuales se libera la bacteria en un órgano diferente al pulmón. Este hallazgo es de suma importancia, ya que estos animales pueden estar diseminando la enfermedad, contribuyendo así a la persistencia de la TB en un hato. Se requieren futuras investigaciones, las cuales midan la relación que existe entre los diversos factores epidemiológicos como el medio ambiente, nutrición, manejo zootécnico, estrés, entre otros, con la excreción de *M. bovis*.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, respuesta inmune, excreción bacteriana, diagnóstico, prueba de tuberculina, interferón gamma (IFN- γ), ELISA, PCR anidada.

SUMMARY

Romero Tejada Aurora. “Association of *Mycobacterium bovis* excretion with the specific immune response in a high prevalence herd”. Directed by Dra. Camila Arriaga Díaz, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Dr. Feliciano Milián Suazo. Invited Co-adviser: Dr. Ciro Estrada Chávez.

Bovine tuberculosis (TB) is considered as a serious public health problem and one of the main causes of economic losses in the dairy cattle industry. The objective of the present research was to study the association between bacterial excretion and the specific immune response to *Mycobacterium bovis* measured by the tuberculin, interferon gamma (IFN- γ) and ELISA tests. Sixty nine Holstein Friesian bovines from a high prevalence herd (Alamaraz, FESC-4) were tested with these diagnostic techniques and a nasal swab was collected every month for a 6 month period, with the aim to detect the presence of *M.bovis* DNA using a nested PCR. Animals positive to the tuberculin test were slaughtered and the presence of lesions suggestive of TB was determined. Eight animals were detected as excretory by the nested PCR, being all of them positive to the tuberculin and IFN- γ tests and only one positive to the ELISA test. Six of the eight excretory animals presented TB compatible lesions in associated lymph nodes of the respiratory tract and two of them in the lung. No lesions were observed in two of the excretory bovines. The Cohen's *kappa* values obtained between the bacterial excretion and the immune response were low; however, the IFN- γ and the tuberculin test showed higher concordance (39 y 29% respectively) than the ELISA test (4%). This is probably due to the fact that the cellular immune response and the delayed-type hypersensitivity produce tissue damage and necrosis with the possible bacterial delivery to the airborne route, although the epidemiological factors that can be involved in such presentation should also be considered. The presence of excretory animals without visible lesions has been reported before, and it could be attributed to the occurrence of the primary complex from which the bacteria is delivered, in an organ different than the lung. This finding is very important, because these animals can be disseminating the disease, thus contributing to the persistence of TB in a farm. Further investigations to measure the relationship between the epidemiological factors such as environment, nutrition, management, stress, and others, with *M. bovis* excretion are required.

Keywords: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, immune response, bacterial excretion, diagnosis, tuberculin test, interferon gamma (IFN- γ) test, ELISA, nested PCR.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
ÍNDICE GENERAL	VI
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de las micobacterias	1
1.2 Diagnóstico	2
1.2.1 Prueba de tuberculina	2
1.2.2 Prueba de Interferón gama (IFN- γ)	3
1.2.3 Pruebas inmunoenzimáticas (ELISA)	3
1.2.4 Pruebas moleculares	4
1.3 Antecedentes directos	5
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVO GENERAL	8
5. OBEJTIVOS PARTICULARES	8
6. MATERIAL Y MÉTODOS	9
6.1 Animales	9
6.2 Prueba de tuberculina	10
6.3 Determinación de IFN- γ	10
6.4 Prueba inmunoenzimática (ELISA)	10
6.5 Toma de muestras de exudados nasales	11
6.6 Cuantificación de ADN genómico	11
6.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR anidada y control)	11
6.8 Inspección post-mortem	12
6.9 Histopatología	13
6.10 Aislamiento bacteriano	13
6.11 Análisis estadísticos	14
7. RESULTADOS	20
7.1 Animales estudiados	20
7.2 Diagnóstico	20
7.3 Hallazgos patológicos	24

7.4 Lesiones histopatológicas	24
7.5 PCR anidada y PCR control	28
7.6 Características de los animales excretores	28
7.7 Concordancia entre excreción bacteriana y respuesta inmune	29
8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES	54
10. ANEXOS	55
10.1 Anexo 1. Protocolo de la prueba inmunoenzimática (ELISA)	55
10.2 Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN genómico	56
10.3 Anexo 3. Características de las PCR utilizadas	58
11. APÉNDICE DE REACTIVOS	59
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Resultados generales de las pruebas realizadas a los 69 bovinos para evaluar su estado inmunológico.	21
Cuadro 2 Distribución y porcentaje de los diferentes patrones inmunes obtenidos en las tres pruebas realizadas a los 69 animales estudiados.	22
Cuadro 3 Número y porcentaje de animales que mantuvieron o cambiaron su perfil inmunológico después de 6 meses de estudio con base a las tres pruebas realizadas.	23
Cuadro 4 Coeficiente de concordancia (Cohen's <i>Kappa</i>) obtenido entre las tres pruebas inmunológicas	25
Cuadro 5 Distribución y porcentaje de los perfiles inmunológicos y los hallazgos patológicos de los 29 bovinos sacrificados en el estudio	26
Cuadro 6 Hallazgos patológicos, localización y características de las lesiones de los bovinos sacrificados	27
Cuadro 7 Características importantes de los animales excretores detectados por medio de la PCR anidada	31
Cuadro 8 Coeficientes de concordancia (Cohen's <i>kappa</i>) obtenidos entre la excreción bacteriana y las pruebas inmunológicas	39
Cuadro 9 Coeficientes de concordancia (Cohen's <i>kappa</i>) obtenidos entre la patología y las pruebas inmunes	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nódulo mediastínico mayor de 50 cm perteneciente a una vaca tuberculosa.	15
Figura 2. Múltiples lesiones granulomatosas en el parénquima de los nódulos retrofaríngeos y mediastínicos en vacas tuberculosas.	16
Figura 3. Clasificación histopatológica tipo I.	17
Figura 4. Clasificación histopatológica tipo II.	18
Figura 5. Clasificación histopatológica tipo III.	19
Figura 6. ADN cuantificado mediante Fluorometría para evaluar la sensibilidad de la PCR anidada.	32
Figura 7. ADN cuantificado mediante Espectrofotometría para evaluar la sensibilidad de la PCR anidada.	33
Figura 8. Controles utilizados en la PCR anidada.	34
Figura 9. ADN genómico obtenido a partir de muestras de exudado nasal.	35
Figura 10. Productos de amplificación del gen que codifica el citocromo b en muestras de exudado nasal (PCR control).	36
Figura 11. Muestras de exudado nasal positivas en la PCR anidada.	37
Figura 12. Identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes por medio de la tinción de Zielh-Neelsen (ZN)	38

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis humana y la tuberculosis bovina (TB) continúan siendo uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo (Wedlock y Col., 2002), ambas enfermedades son causadas por dos especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, siendo *M. tuberculosis* y *M. bovis* las que afectan al humano y al bovino respectivamente. La enfermedad en los humanos es responsable de aproximadamente 3 millones de muertes por año (Flynn, 2001; Milián y Col., 2000), mientras que en el ganado disminuye la producción de leche y de carne, causando grandes pérdidas económicas. Aunado a esto, se suman las pérdidas por decomisos y los costos de programas de control y erradicación. La TB además es considerada como una zoonosis importante (Independent Scientific Group on Cattle TB, 2000; Morris, 1994; Morrison, 2000).

En México la ganadería cuenta con un estimado de 4,500,000 cabezas de ganado lechero y 29,000,000 cabezas de ganado de carne, en donde la presencia de la enfermedad en nuestro país se contabiliza en pérdidas hasta del 17% en la producción láctea (SAGARPA, 1998).

La tuberculosis en humanos provocada por *M. bovis* no esta muy documentada; sin embargo, algunos estudios publicados estiman que el porcentaje de humanos contagiados en el mundo con *M. bovis* es alrededor de 3.1% (Grange, 2001). En Latinoamérica, *M. bovis* es responsable de causar alrededor de 7,000 casos de tuberculosis humana cada año (Milián y Col., 2000), en donde el 2% de los casos son de presentación pulmonar y el 8% extra-pulmonar. En México, la tuberculosis humana causada por *M. bovis* representa del 8 al 15% de los casos reportados (Díaz, 2000).

1.1 Generalidades de las micobacterias

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico causada por una micobacteria perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, la cual es un bacilo delgado, ligeramente curvo de 0.2 a 0.6 μm de diámetro y de 1 a 4 μm de longitud. Por la estructura y composición de la pared celular de las micobacterias, existen más de 100 especies de este género y se pueden dividir en tres grupos (Cuadro A).

CUADRO A. Diferentes especies del género *Mycobacterium*.

COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. microti</i>
COMPLEJO LEPRAE	<i>M. leprae</i> y <i>M. Leprae-murium</i>
COMPLEJO <i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> y <i>M. xenopi</i>

Los integrantes del complejo *M. tuberculosis* son aerobios estrictos y crecen más lentamente en medios de cultivo específicos por 3 o 4 semanas. Los lípidos de la pared constituyen el 40% de su peso seco, entre los cuales se encuentran el ácido micólico, glucopeptidolípidos, lipooligosacáridos, glicolípidos fenólicos, sulfátidos, ceras, fosfolípidos y lipoarabinomanan o LAM, el cual es un antígeno importante en el desarrollo de la inmunidad y enfermedad (Collins, 2001).

1.2 Diagnóstico

El control y erradicación de la TB depende de la detección oportuna y remoción de la fuente de infección tanto dentro como fuera del establo. Es por ello que la rápida identificación y eliminación de los animales infectados es un requisito en el control de la enfermedad.

1.2.1 Prueba de tuberculina

Se han utilizado diversos métodos para el diagnóstico de la TB. La prueba de la tuberculina, aprobada y utilizada como un método diagnóstico oficial desde 1947 en muchos países, mide la hipersensibilidad tardía (HT). Esta prueba utiliza el derivado proteico purificado (PPD) preparado a partir de los sobrenadantes de cultivos líquidos de micobacterias. Esta prueba muestra una sensibilidad del 77% al 95 % (González, 1999) y una especificidad del 90% (Monaghan y Col., 1994), implicando que más del 10% de los animales no son detectados. Los resultados se basan en la medición de la reacción local al PPD, la cual está sujeta al error en la interpretación por parte del operador, al intervalo de espera de 60 días entre pruebas y la reacción cruzada con micobacterias ambientales (Morrison y Col, 2000; Pollock y Col., 2000; Rodhes y Col., 2000; Bryce y Col., 2001; Costello y Col., 1997). Para descartar y diferenciar las reacciones inespecíficas a micobacterias atípicas, se ha utilizado la prueba doble comparativa dentro de los 10 o 60 días posteriores a la prueba simple caudal, en la que se aplican PPD bovino y PPD aviar simultáneamente en la tabla del cuello del bovino.

El hecho de que los animales no respondan a la tuberculina (anergia), puede deberse a infecciones recientes o generalizadas, y la frecuencia de estos casos puede llegar hasta un 20 %. Este porcentaje puede ser mayor en zonas o regiones en donde no se lleva a cabo un programa de detección y eliminación rutinaria de reactores (Pollock, 2001).

A pesar de estas limitaciones, la prueba de tuberculina se ha utilizado con éxito en el programa de control y erradicación de la TB en distintos países.

1.2.2 Prueba de Interferón gama (IFN- γ)

Debido a la variable sensibilidad y especificidad de la prueba de tuberculina, se ha propuesto la utilización de pruebas alternativas o complementarias en el diagnóstico de la TB (Ryan y Col., 2000; Walraves y Col., 2002; Wood y Col., 2001; Morrison y Col., 2000). Un ejemplo es la respuesta de los linfocitos T CD4⁺, la cual puede ser detectada midiendo su proliferación *in vitro* a antígenos de *M. bovis*. Sin embargo, esta técnica requiere de la separación de los linfocitos y el uso de isótopos radioactivos (Pollock y Col., 1994).

Otra alternativa de diagnóstico es la determinación de IFN- γ , la cual es una citocina liberada por los linfocitos T, cuya participación es importante durante el desarrollo de la inmunidad de tipo celular específica (Flynn, 2001; Wood, 2001; Jiménez, 2001; Ritacco y Col., 1991; Pollock, 2001; Orme, 2000; Flynn, 2000; García-Sancho, 2001). Esta prueba presenta una sensibilidad y especificidad superior que la prueba de tuberculina. Algunos de los trabajos mencionan que la sensibilidad de esta prueba oscila desde el 88% al 97%, mientras que su especificidad es del 90% al 96% (Wood, 2000; Monaghan y Col., 1995; Ryan y Col., 2000). Diversas investigaciones han reportado que la prueba de tuberculina y la prueba de IFN- γ detectan un número similar de animales infectados, aunque algunos de estos bovinos muestran positividad a la prueba de IFN- γ y negatividad a la tuberculinización y viceversa, pero en una menor proporción. El uso de ambas pruebas para diagnosticar TB, mejora la sensibilidad en un 95.2% (Wood, 2001). Ryan y Col. (2000), evaluaron la prueba de IFN- γ para el diagnóstico de TB a los 8 y 28 días después de la tuberculinización, obteniendo una sensibilidad y especificidad de 85% y 93%, respectivamente. Estos resultados apoyan el uso de esta técnica como complemento de la prueba de tuberculina.

En estudios experimentales, la prueba de IFN- γ permitió la identificación temprana de animales infectados desde los 14 días post-inoculación, mientras que la reactividad a la prueba de tuberculina, solo se observó después de 28 días de esos mismos animales (Buddle, 1995). Otro trabajo menciona que la prueba de IFN- γ puede detectar a los animales infectados desde 90 hasta 150 días antes que la prueba de tuberculina (Wood, 2001).

1.2.3 Pruebas inmunoenzimáticas

Los ensayos inmunoenzimáticos como la prueba de ELISA miden la respuesta inmune humoral hacia *M. bovis*, pero en general se ha observado una baja producción de anticuerpos en animales tuberculosos (Neill y Col., 1994a, 1994b, 2001; Morrison y Col., 2000; Costello y Col., 1997; Lightbody y Col., 1998); sin embargo, se han detectado altos niveles de anticuerpos en el suero de animales infectados en estados avanzados de la infección o en animales con lesiones diseminadas (Neill, 2001; Pollock, 2001; Ritacco y Col., 1991). Diversos estudios han demostrado que existe una relación inversa entre la respuesta inmune celular y humoral en la tuberculosis (Ritacco y Col., 1991), por lo que aquellos animales anérgicos a la tuberculina

pueden ser detectados en pruebas de ELISA (Estrada-Chávez y Col., 2001). Es posible que algunos animales no logren montar una adecuada respuesta humoral debido a la baja cantidad de antígenos bacterianos solubles (Costello y Col., 1997), ya que se presume que la dosis infectiva que puede producir la enfermedad es baja (Neill y Col., 2001; Francis 1958; Goodchild y Col., 2001).

Lightbody y Col., (1998), detectaron por ELISA al 28% de animales positivos a la prueba de tuberculina sin lesiones visibles al rastro. Esta prueba presenta una sensibilidad del 30% al 64%, considerada como baja (Costello y Col., 1997). Sin embargo mejora considerablemente cuando se lleva a cabo de dos a tres semanas posteriores a la tuberculinización (Lightbody y Col., 1998). La especificidad de esta prueba oscila entre el 90% al 95% (Costello y Col., 1997; Silva, 2001), mostrando una correlación con la prueba de tuberculina del 78% (Silva, 2001).

Sin embargo, la prueba de ELISA no alcanza niveles adecuados de sensibilidad para poder utilizarla como una prueba de rutina única, excepto en países o regiones en donde no se realiza un programa de erradicación, permitiendo que los animales alcancen etapas avanzadas de la enfermedad y la producción de anticuerpos sea mayor (Pollock y Col., 2001).

1.2.4 Pruebas moleculares

Las técnicas de amplificación de ácido nucleico (ADN), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proveen una posibilidad en el diagnóstico rápido de la tuberculosis en humanos y animales, mostrando alta sensibilidad y especificidad (Miyazaki y Col., 1993; Mangiapan y Col., 1996; Bennedsen y Col., 1996; Rodriguez y Col., 1995).

A través de esta técnica, es posible detectar animales infectados que estén diseminando la enfermedad. Al comparar esta técnica utilizando muestras clínicas (tejido, leche, exudado nasal, sangre) de animales sacrificados en rastros de una zona endémica, con la inspección post-mortem, el aislamiento y la prueba de ELISA, se encontró asociación significativa entre la presencia de lesiones y la positividad en PCR (Arriaga y Col., 1999).

Fabrizio y col. (1998), demostraron que de un grupo de animales detectados como PPD negativos, el 52% fueron diagnosticados como falsos negativos. Dicha detección se hizo a través de la amplificación del segmento de inserción *IS6110* mediante PCR anidada e hibridación en 100 muestras de leche, exudado nasal y punciones con aguja fina de nódulos linfoides. Estos resultados sugieren que la prueba de tuberculina debe ser corroborada con pruebas moleculares.

En Octubre de 1999 se aprobó una resolución de la Asociación de Salud Animal de los Estados Unidos de Norteamérica (USAHA, 2001) para utilizar PCR como prueba confirmatoria para identificar *M. bovis* en muestras de tejidos fijados en formol.

1.3 Antecedentes directos

Mycobacterium bovis es capaz de infectar una gran cantidad de especies animales. Las vías más comunes de infección son la vía respiratoria y la digestiva (de Kantor y Col., 1978; Dannenberg, 1993; Neill y Col., 1992, 1994a, 1994b, 2001; Morris, 1994; Goodchild y Col., 2001; Costello y Col., 1998) y los bacilos pueden ser excretados en el aire espirado, en el esputo, en el moco nasal, en las heces, en la leche, en la orina, en las secreciones vaginales y uterinas, en el semen y en los nódulos linfáticos supurantes (Independent Scientific Group on Cattle TB, 2000). Se ha comprobado que existe la probabilidad de que el ganado se infecte con objetos contaminados, y esto depende de su curiosidad y el rango de jerarquía en el establo (Goodchild y col., 2001).

La transmisión por vía aérea de la TB ocurre durante el contacto vaca-vaca y se requiere de la presencia de un animal infectado y uno susceptible en el mismo grupo. La eliminación la micobacteria en pequeñas gotas de aerosol de 5 a 15 μm de diámetro expulsadas de una vaca con tuberculosis pulmonar, son suficientes para alcanzar el tejido pulmonar y la luz alveolar. Las gotas de aerosol pueden provenir directamente del tracto respiratorio (esputo), o bien de polvo contaminado con el bacilo (Goodchild y Col., 2001).

La micobacteria que penetra por la vía aérea e invade los bronquios hasta llegar a los alveolos es fagocitada por los macrófagos alveolares (Riley, 1995). Este mecanismo se facilita por la presencia de receptores en los macrófagos que permiten su entrada, tales como receptores del complemento CR1 y CR3, CD39, CD14, receptores de manosa y receptores de la proteína surfactante A (Riley, 1995; Ernst, 1998).

La micobacteria tiene la capacidad de inhibir la fusión del fago-lisosoma y asegurar su supervivencia (Deretic, 1999), evadir (Balcewicz y Col., 1998; Keane y Col., 2000) y estimular la apoptosis de los macrófagos infectados (Dürbaum y Col., 1996; Rojas y Col., 1999; Silva y Col., 2001; Gao y Col., 2000; Zychlinsky, 1997; Behnia y Col., 2000; Oddo y Col., 1998), e inhibir la activación de los macrófagos a través del bloqueo de la síntesis de interferón gama (Ting y Col., 1999). Se piensa que tiene la capacidad de estimular la producción de factor transformador de crecimiento beta (TGF- β) en lugar de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual es un modulador negativo de la respuesta inmune (Jiménez y Col., 2001; García-Sancho, 2001; Flynn, 2001 y 2001; Orme, 2000; Neill y Col., 2001). El organismo responde a la infección con la formación de tubérculos o granulomas para localizar la enfermedad y permitir la destrucción del microorganismo a través de anaerobiosis (Dannenberg, 1991 y 1993; Morrison y Col., 2000; Neill y Col., 1994 y 2001; Cassidy y Col., 1998 y 1999).

Gran parte de los animales infectados naturalmente exhiben una patología limitada y una escasa excreción nasal de micobacterias, lo que indica que este evento ocurre en etapas tempranas de la infección (Cassidy y Col., 1999; Neill y Col., 1988, 1989, 1991, 1992, 1994a, 1994b, 2001; Morrison y Col., 2000; Menzies, 2000; Goodchild y Col., 2001; Ritacco y Col.,

1991). Esto se ha corroborado con experimentos donde convivieron animales PPD negativos con animales reactores durante 4 y 7 meses, observando que el porcentaje de animales PPD negativos infectados al final del trabajo fue bajo (O'Reilly y Col., 1988). En dicho experimento se concluyó que la transmisión es baja cuando los animales son alojados en lugares con adecuada ventilación. Se observó lo contrario al comprobar que el ganado susceptible se infectaba cuando convivía durante el periodo inicial de la infección experimental con los animales inoculados (Neill y Col., 1989, 1991, 1992).

En animales infectados experimentalmente con diferentes dosis de *M. bovis* se ha comprobado que ésta juega un papel importante en la severidad de la enfermedad. Los animales que recibieron dosis altas (5×10^5 – 10^6 UFC) vía intratraqueal o intranasal, desarrollaron múltiples lesiones. Los animales inoculados con dosis bajas (5×10^2 – 10^4 UFC), desarrollaron pocas lesiones, generalmente pequeñas y localizadas (Neill, 1994a). Los animales infectados experimentalmente que desarrollaron una patología limitada, se convirtieron en excretores intermitentes; sugiriendo que la infección natural es iniciada usualmente con dosis bajas de *M. bovis* (Neill y Col., 1988, 1989, 1991, 1992, 1994a, 1994b, 2001).

La importancia de la presencia de un estado de latencia previo a una etapa de eliminación de la micobacteria, depende en gran parte de la dosis de inoculación. Esto se ha comprobado en diversos experimentos en donde los animales inoculados intranasalmente con 1×10^6 UFC, 1×10^4 UFC y 92UFC eliminaron la bacteria a los 11, 18 y 100 días respectivamente, llegando a la conclusión que el tiempo de latencia es inversamente proporcional a la cantidad e bacterias inoculadas (Goodchild y Col., 2001).

La capacidad de un animal con TB de ser infeccioso cambia con el transcurso del tiempo. Convencionalmente, un período de latencia precede al período al que el animal puede ser infeccioso para otros. El estado de latencia comprende a un período de no respuesta, en el cual no se puede detectar una reacción de hipersensibilidad tardía y una fase de reacción, en la cual tiene la capacidad de responder a dicha prueba, pero sin excretar la micobacteria. El período de ausencia de respuesta a la prueba simple caudal puede variar entre 8 y 65 días (Goodchild y Col., 2001).

La transmisión congénita de la tuberculosis ha sido ampliamente estudiada en el humano. Cantwell (1994) reportó que la bacteremia durante la gestación provoca la infección placentaria y fetal a través de la vía hematogena, por aspiración o por ingestión del líquido amniótico contaminado, lo que ocasiona que los neonatos enfermos presenten una historia clínica característica de tuberculosis. En cuanto al bovino, Francis (1958) menciona que el 5 % de las vacas infectadas presentan TB uterina con metritis y solo el 1% de los becerros se infectan de manera congénita, siendo la vía hematogena la principal ruta de infección.

2. JUSTIFICACIÓN

La TB constituye un riesgo de salud pública importante en todo el mundo, además de ocasionar grandes pérdidas económicas en la industria ganadera. En México se calcula que por lo menos, un 8% de casos de tuberculosis humana pueden ser atribuidos a *M. bovis*.

Recientemente, debido a la alta persistencia de la TB, se ha reconsiderado el estudio de la transmisión y excreción de la micobacteria, así como también de los factores epidemiológicos involucrados en su presentación. La respuesta inmune de los bovinos podría influir en forma decisiva en la diseminación de la micobacteria al medio ambiente, favoreciendo así su transmisión. Debido a lo anterior, sería importante definir si existe una asociación de la respuesta inmune humoral y celular con la excreción del bacilo.

El diagnóstico molecular de la TB permite identificar el agente causal con alta sensibilidad y especificidad. En particular la PCR permite amplificar segmentos del genoma bacteriano prácticamente a partir de cualquier tipo de muestra biológica. La determinación de la excreción de la micobacteria mediante una PCR anidada y de los parámetros inmunológicos durante este evento en animales provenientes de un hato de alta prevalencia, permitirán definir la importancia de la vía de transmisión aerógena en la persistencia de la TB.

3. HIPÓTESIS

La excreción de *Mycobacterium bovis* en bovinos infectados se asocia con la respuesta inmune específica humoral y celular.

4. OBJETIVO GENERAL

Asociar la presencia del ADN de *Mycobacterium bovis* en muestras de exudado nasal de bovinos tuberculosos con la respuesta inmune humoral y celular.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1 Determinar la respuesta de hipersensibilidad tardía, la liberación de IFN- γ y la producción de anticuerpos contra el PPD en animales provenientes de un hato de alta prevalencia.
- 5.2 Determinar la presencia de ADN de *M. bovis* a través de una PCR anidada en muestras de exudado nasal, colectadas periódicamente durante 6 meses.
- 5.3 Confirmar la TB en los animales positivos del estudio mediante la inspección post mortem, histopatología y bacteriología, utilizando muestras de tejido.
- 5.4 Asociar a través de análisis estadísticos la respuesta inmune con la excreción bacteriana en los animales.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron 69 hembras de la raza Holstein Friesian del rancho Almaraz de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (U.N.A.M.), el cual es una explotación semi-intensiva en el área de novillas de reemplazo e intensiva en el área de producción. A estos animales que oscilaron en edades entre los 14 y los 102 meses, se les realizó la prueba de tuberculina simple caudal y se obtuvieron muestras de suero, sangre completa y exudado nasal (cada 30 días durante 6 meses), con la finalidad de realizar las distintas pruebas de diagnóstico. Se sacrificaron 29 animales y se llevó a cabo la inspección post-mortem (IP) para obtener muestras de los tejidos con y sin lesiones, con la finalidad de realizar estudios histopatológicos y de aislamiento bacteriano (Diagrama 1).

El rancho se encuentra en una etapa de control y eliminación de animales reactivos a la prueba de tuberculina desde el 30 de Julio del 2000, realizada con el apoyo de la Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CANETB).

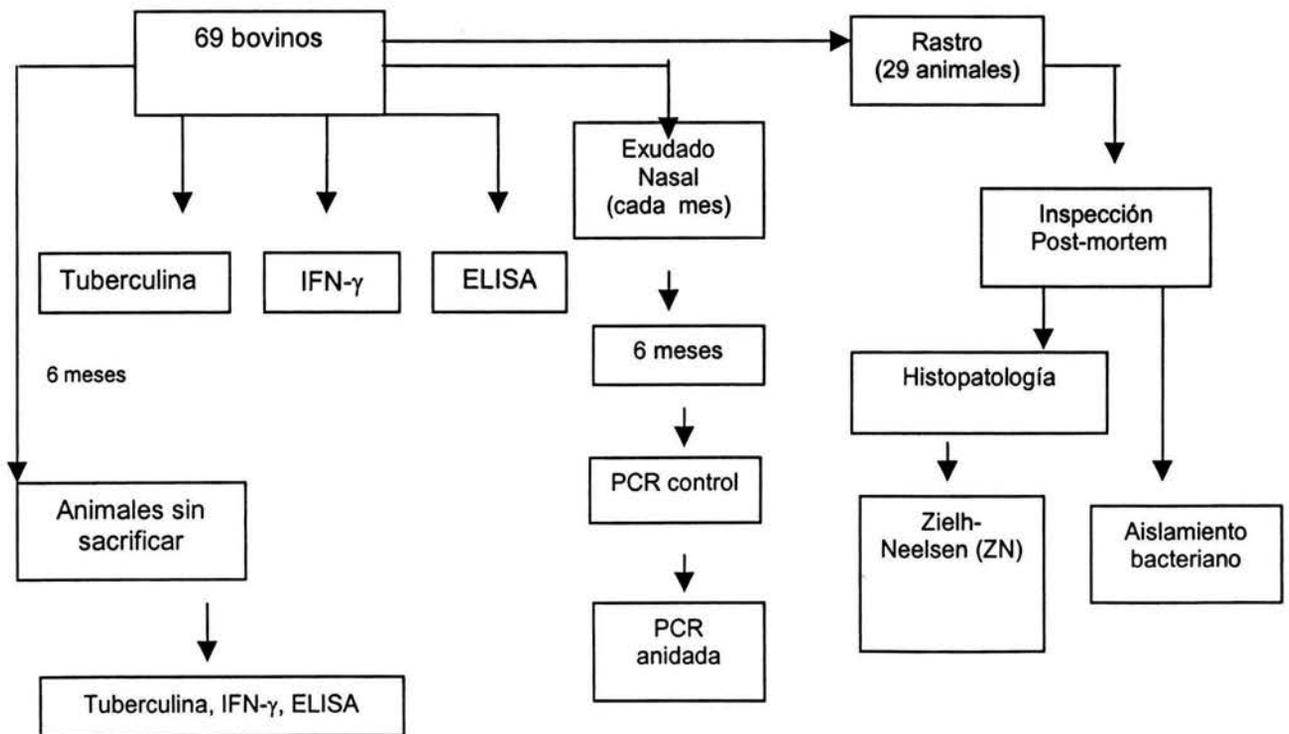


Diagrama 1. Estrategia del trabajo de investigación.

6.2 Prueba de tuberculina

Se aplicó la prueba simple caudal inoculando 0.1 ml intradérmicamente de PPD bovino (PRONAVIBE), elaborado con *M. bovis* cepa AN5, en el pliegue ano-caudal, midiendo previamente el grosor de la piel antes de la inoculación y a las 72 horas posteriores. Los criterios para detectar animales reactivos y negativos se tomaron de acuerdo a la CANETB. Se determinaron como animales negativos aquellos que presentaron una reacción de HT de 0 a 2 mm a las 72 horas posteriores a la inoculación; como sospechosos a aquellos animales de 2.1 a 3.9 mm y como positivos a los que presentaron más de 4 mm.

6.3 Determinación de interferón gama (IFN- γ)

Se tomaron muestras de sangre completa con anticoagulante (Heparina) en tubos estériles (*Vacutainer Systems, Becton Dickinson*) a los 69 animales dentro de los 15 días posteriores de la prueba de tuberculina. La técnica se realizó con un kit comercial (BOVIGAMTM CSL), la cual es una prueba inmunoenzimática (ELISA) tipo sandwich.

Para estimular los linfocitos en las muestras sanguíneas se procuró procesarlas dentro de las 3 horas posteriores a su colección. Se utilizaron placas de 24 pozos (*24 Cell Culture Cluster, COSTAR*) para poner 1.5 ml de sangre completa y agregar 100 μ l de PPD bovino y PPD aviar incluidos en el kit (300 μ g/ml), además de 100 μ l de PBS 1X (Buffer de fosfatos) como blanco. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂ atmosférico (*Thermoforma, series II Water Jacketed CO₂ incubator*) por 24 horas. Al día siguiente se cosechó el plasma con precaución de no contaminarlo con sedimento y se realizó la prueba inmunoenzimática según las indicaciones del kit. Las densidades ópticas de las placas de IFN- γ se leyeron utilizando un filtro de 450nm en un lector de ELISA (*Benchmark Plus Microplate spectrophotometer, BIO-RAD*).

Se utilizaron controles positivos y negativos por triplicado en cada placa, los cuales están incluidos en el kit. Para la validación de la prueba fueron evaluadas las densidades ópticas (D.O) de los controles, y se aceptó un rango del control negativo de < 0.130 y > 0.700 en el positivo. Posteriormente se comprobó que las densidades ópticas del blanco (PBS 1X) fueran menores a las de las D.O de los dos antígenos utilizados. Los valores de absorbancia del PPD bovino superiores por 0.050 al blanco y al PPD aviar, se dieron como resultado positivo a *M. bovis*.

6.4 Prueba inmunoenzimática (ELISA)

Se tomaron muestras sanguíneas de los animales al momento de aplicar la prueba de tuberculina para obtener los sueros. Los antígenos que se utilizaron en ésta técnica fueron los filtrados de cultivo de 6 semanas de *M. avium* D4 y *M. bovis* AN5 (Proporcionados por el Dr. Fernando Díaz Otero), a los cuales se les determinó la concentración de proteína mediante el

método de Bradford (*BIO-RAD*) y se ajustó la concentración final de cada antígeno a 10 µg/ml. El protocolo de trabajo utilizado, se muestra en el *Anexo 1*.

Para interpretar los resultados obtenidos se realizó la prueba de ELISA a 40 animales negativos a TB (animales provenientes del mismo rancho negativos a la prueba de tuberculina e IFN-γ) con el protocolo descrito previamente para determinar el punto de corte. Se obtuvo el promedio de las densidades ópticas y se le sumaron dos desviaciones estándar de la media. El punto de corte establecido fue de 0.32, en donde los animales con D.O. mayores al punto de corte se clasificaron como positivos.

6.5 Toma de muestras de exudados nasales

Los exudados nasales de los 69 animales del estudio se recolectaron mensualmente (durante 6 meses) con hisopos estériles sumergidos en una solución con 10 ml de PBS 1X estéril. Los animales fueron sometidos a una manga de manejo en donde se les sujetó la cabeza y se introdujo el hisopo nasal en ambas cavidades nasales hasta 10 a 15 cm de profundidad (de Kantor y Col., 1978).

El procedimiento de extracción de ADN bacteriano se realizó con el protocolo citado por Van Soolingen y Col. en 1994 (*Anexo 2*).

6.6 Cuantificación del ADN genómico

La cuantificación del ADN genómico se realizó en un Fluorómetro (*VersaFluor™ Fluorometer, BIO-RAD*) con la utilización de un kit comercial (*Fluorescent DNA Quantitation kit, BIO-RAD*), el cual se basa en la utilización de bisbenzimidazoles como marcador del ADN blanco, según su contenido de pares de bases AT's. Se utilizó un filtro de excitación de 360nm y uno de emisión de 460nm.

6.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR anidada y PCR control)

En las muestras de exudado nasal obtenidas se buscó la presencia de ADN de *Mycobacterium bovis* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores TB1-F(5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') (*MWG-Biotech*) y TB1-R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA 3') para amplificar una región de 372 pb del gen que codifica la proteína de secreción **MPB70** del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Posteriormente se realizó la PCR anidada con los iniciadores M22/3 (5'-GCTGACGGCTGCACTGTCGGGC-3') y M22/4 (5'-CGTTGGCCGGGCTGGTTTGGCC-3') que amplifican 208 pb del gen MPB70, empleando como templates los productos de amplificación con los oligonucleótidos TB1F y TB1R (*Anexo 3*).

Para la primera reacción se utilizaron 500 ng (5 µl) de ADN proveniente del exudado nasal previamente cuantificado. Las condiciones finales para 20µl de reacción fueron: MgCl₂

2.5mM (30mM, *BIOTECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS*), dNTP's 1mM (2mM c/u, *BIOTECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS*), 0.8pM de los iniciadores TB1-F y TB1-R (*BIOSELEC*) y 3UI de la DNA Polimerasa Termoestable (5UI/ μ l, *BIOTECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS*), con un programa de amplificación de 13 ciclos totales con 94°C por 45 segundos para la desnaturalización, 58°C por 1 minuto para la alineación y 72°C por 1 minuto para la amplificación, realizado en un termociclador comercial (*Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400*).

Para la PCR anidada se tomaron 5 μ l del PCR simple y las condiciones finales en la reacción de amplificación para 20 μ l fueron: MgCl₂ 2.5mM, dNTP's 1mM, 0.4pM de los iniciadores M22/3 y M22/4 (*MWG-Biotech*) y 3UI de la ADN Polimerasa Termoestable, con un programa de amplificación de 24 ciclos totales con 94°C por 30 segundos para la desnaturalización, 68°C por 30 segundos para la alineación y 72°C por 30 segundos para la amplificación.

Las muestras negativas que se obtuvieron en la PCR anidada fueron evaluadas para descartar cualquier tipo de inhibición endógena de la reacción mediante la realización de una PCR control, utilizando los iniciadores CyB1 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') (*MWG-Biotech*) y CyB2 (5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') que amplifican una región de 375 pb del gen que codifica al Citocromo b mitocondrial (BioTechniques, 1996). La cantidad de ADN utilizado de cada muestra fue de 500ng (5 μ l) y las condiciones finales en la reacción de amplificación para 20 μ l fueron: MgCl₂ 2.5mM, dNTP's 1mM, 1.0pM de los iniciadores CYB1 y CYB2 y 3UI de la ADN Polimerasa Termoestable, con un programa de amplificación de 34 ciclos totales con 94°C para la desnaturalización por 30 segundos, 58°C por 40 segundos para la alineación y 72°C por 30 segundos para la amplificación.

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en el transiluminador (*Transiluminator 4000, Stratagene*) en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ ml). Para corroborar el tamaño de los productos de amplificación se utilizó un marcador de rango bajo de ADN (*ADNpBR322/MspI*) (*BIOTECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS*), empleando 3 μ l del marcador a una a una concentración de 0.05 μ g/ μ l.

6.8 Inspección post-mortem (IP)

Los animales positivos a la prueba de tuberculina se sacrificaron (en el caso de los animales negativos, se tomó el criterio del rancho) y se inspeccionaron minuciosamente los órganos como demanda la CANETB (SAGAR, 1999), con la finalidad de encontrar lesiones compatibles a la TB. Los órganos que se inspeccionaron fueron: A) nódulos linfoides (NL) submandibulares, retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos, pre-escapulares, pre-cruales, iliacos internos y externos, supramamarios y poplíteos, B) tejido pulmonar.

Las lesiones encontradas se clasificaron de acuerdo a su tamaño como:

- (+) Lesiones de ≤ 5 mm de diámetro y de 1 a 2 lesiones visibles
- (++) Lesiones entre $\geq 6 \leq 10$ mm.
- (+++) Lesiones múltiples mayores a 10mm (**Figura 1 y 2**).

Todas las muestras de tejido con o sin lesiones de TB, fueron sometidas a estudios bacteriológicos e histopatológicos.

6.9 Histopatología

Para el estudio histopatológico las muestras se depositaron en formalina al 10% para ser procesadas y teñidas con HE (Hematoxilina-Eosina), y posteriormente con la tinción de Zielh-Neelsen (Campuzano, 1998) para detectar la presencia del bacilo. Las lesiones histopatológicas encontradas se clasificaron de la siguiente manera (Campuzano, 1998):

Tipo I: exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloides, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas, además de ausencia de fibrosis (**Figura 3**).

Tipo II: similares a las de tipo I pero mostrando además necrosis caseosa y fibrosis, con diversos grados de calcificación (**Figura 4**).

Tipo III: corresponden a la lesión típica del granuloma, compuestos de una capa fibrosa gruesa externa y necrosis caseosa central (**Figura 5**).

6.10 Aislamiento bacteriano

Para el aislamiento bacteriano las muestras se depositaron en una solución saturada de Borato de Sodio al 6% para ser procesadas en el laboratorio.

Una vez recolectadas las muestras de tejido se maceraron en un mortero estéril, para lo cual se limpiaron de toda la grasa periférica. Se agregó la misma cantidad de agua estéril al macerado. La descontaminación se realizó con Hidróxido de Sodio (NaOH) al 4% (con rojo de fenol como indicador), y las muestras se incubaron 20 minutos a 37°C para posteriormente ser centrifugadas a 2,800 rpm durante 25 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 2 gotas de ácido clorhídrico (HCl) 1N para neutralizar el pH de las muestras y poder ser cultivadas.

Las muestras se cultivaron por duplicado en los medios Stonebrink, el cual es selectivo para el crecimiento de *M. bovis*, y una vez en Löwenstein-Jensen, selectivo para el crecimiento de *M. tuberculosis*. Los cultivos se incubaron por 9 semanas a 37°C, revisando y evaluando semanalmente el crecimiento bacteriano.

Las colonias que crecieron durante los primeros 7 días post-cultivo en uno o ambos medios, y presentaron una coloración amarillenta-naranja, se diagnosticaron como cepas atípicas. El crecimiento en el medio de Stonebrink de colonias redondas, ligeramente elevadas, de color blanco cremoso y nacarado, fueron sometidas a la tinción de Ziehl-Neelsen y a las principales pruebas bioquímicas a las 4 semanas de crecimiento (niacina, catalasa y nitratos) para tipificar la cepa aislada como *M. bovis*.

6.11 Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de Cohen's Kappa (STAT versión 7.1), la cual permite medir el grado de concordancia existente entre mediciones de la misma categoría estudiada. Para este trabajo se evaluó la concordancia que existe entre las pruebas de tuberculina, la de IFN- γ y la de ELISA para el diagnóstico de la TB, y la concordancia entre la excreción bacteriana con las pruebas inmunológicas.

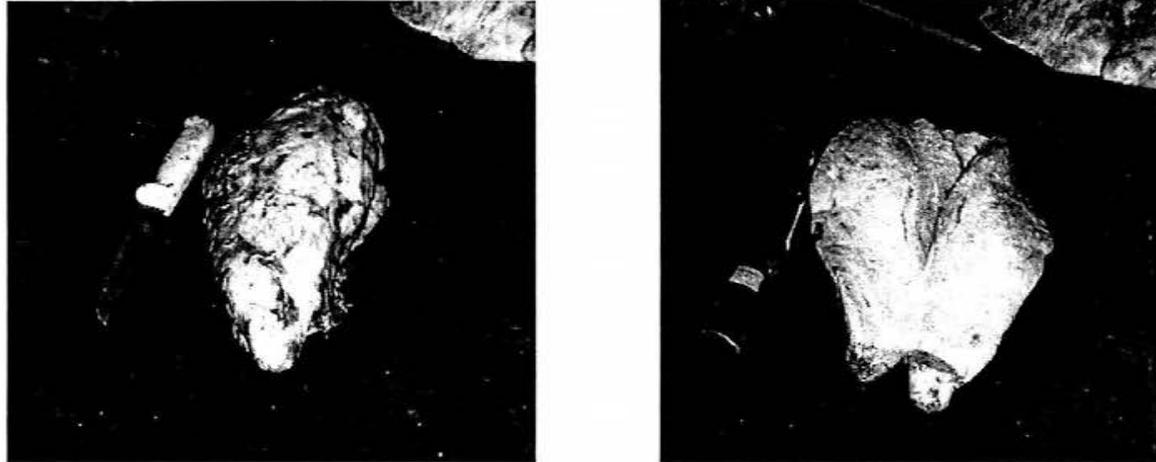


Figura 1. Nódulo mediastínico mayor de 50 cm perteneciente a una vaca positiva a la prueba de tuberculina (vaca 212). Compárese el tamaño del cuchillo con el tejido

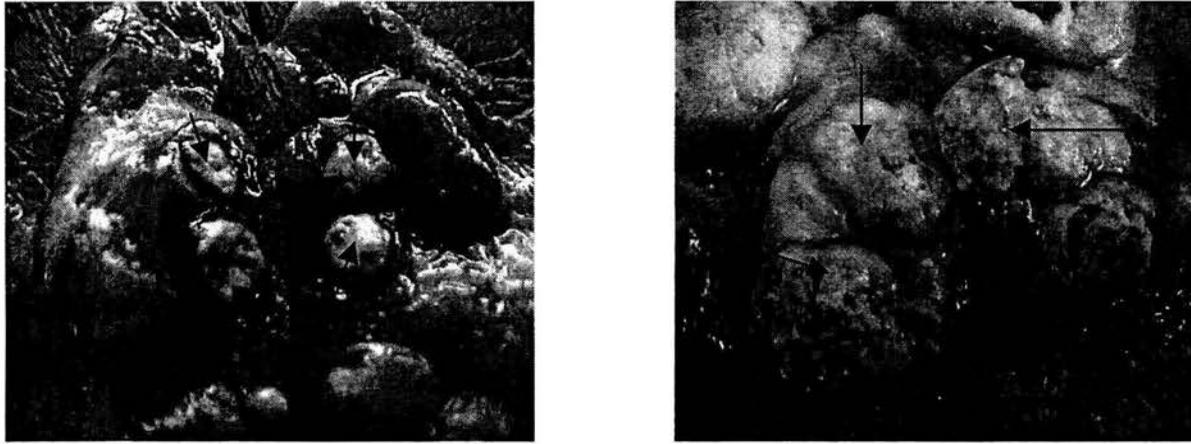


Figura 2. Múltiples lesiones granulomatosas en el parénquima de nódulos retrofaríngeos (izquierda) y mediastínicos (derecha) en vacas tuberculosas.

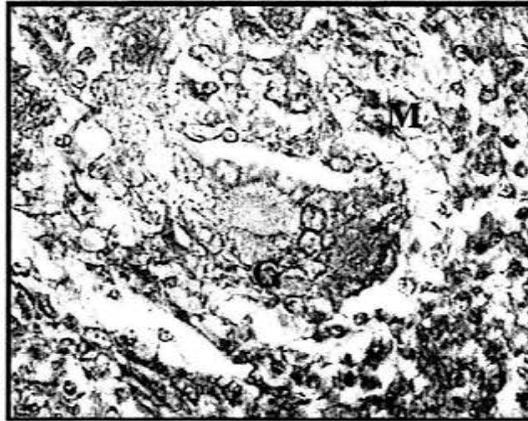


Figura 3. Clasificación histopatológica Tipo I: Exudado de monocitos (**M**) , macrófagos, células gigantes (**G**) y linfocitos, además de la ausencia de fibrosis y calcificación. Se observa una célula gigante al centro y un acumulo de células inflamatorias sin calcificación y fibrosis (100X).

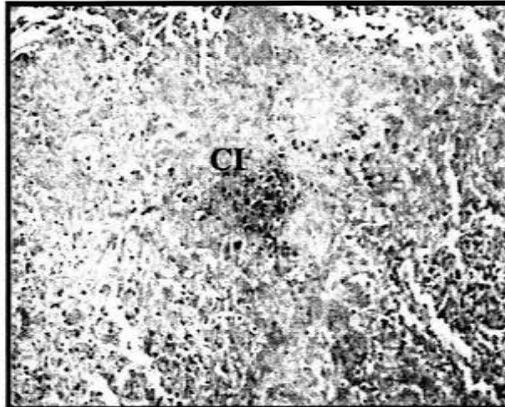


Figura 4. Clasificación histopatológica Tipo II: Lesión similar al de tipo I, mostrando un leve grado de necrosis caseosa y fibrosis. Al centro se observa un acumulo de células inflamatorias (CI) con una leve calcificación y fibrosis periférica (40X).

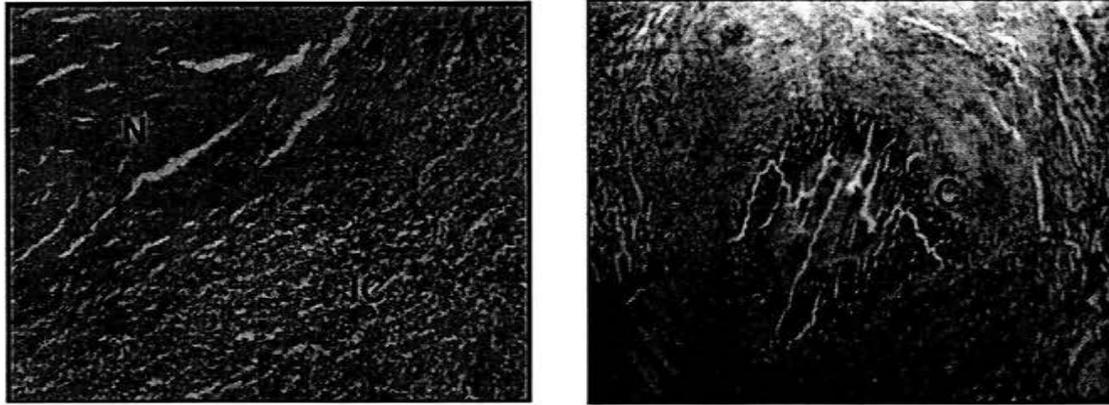


Figura 5. Clasificación histopatológica Tipo III: Lesión típica del granuloma, compuestos de una capa fibrosa gruesa externa y necrosis caseosa central. A la izquierda se observa el centro de necrosis caseosa (**N**) y detritos celulares y a la periferia se observa un infiltrado celular predominantemente mononuclear (**IC**) (HE, 40X) . A la derecha se observa una lesión con un grado de calcificación severa (**C**), rodeada por detritos celulares y células inflamatorias (HE, 40X).

7. RESULTADOS

7.1 Animales estudiados

Para este trabajo se utilizaron 69 hembras de la raza Holstein Friesian con la finalidad de asociar la presencia de ADN de *M. bovis* en el exudado nasal y la respuesta inmune celular y humoral. Los animales tenían edades entre 14 y 102 meses, de las cuales 28 (40%) estaban gestantes y 41 (60%) vacías. De estos, 14 (20%) eran vaquillas de reemplazo, 16 (23%) vacas de un parto, 16(23%) de dos partos, 12 (18%) de 3 partos, 10 (14%) de 4 partos y 1 (2%) de 5 partos. Todos lo animales pertenecían al rancho Almaraz de la FES-Cuautitlán, U.N.A.M, el cual cuenta con un promedio de 110 bovinos estabulados bajo un sistema intensivo en el área de producción y semi-intensivo en el área de vaquillas de reemplazo. En esta explotación ha sido previamente asilado *M. bovis* y actualmente se encuentra en una etapa de control bajo el esquema de la campaña contra la TB adoptada desde el 30 de julio del 2000, la cual se basa en la realización de la prueba periódica de tuberculina y el sacrificio de los animales reactivos.

7.2 Diagnóstico

Para el diagnóstico se realizaron las pruebas de tuberculina, Interferón gama (IFN- γ) y ELISA a los 69 animales del estudio, con la finalidad de evaluar su estado inmunológico en relación a la TB. La prueba de tuberculina detectó 30 (43%) animales positivos, la prueba de IFN- γ 24 (35%) y la de ELISA 6 (9%) (**Cuadro 1**). Se observaron 6 patrones de respuesta inmune diferentes con base a las tres pruebas realizadas, de los cuales, el patrón negativo a todas las pruebas predominó (n=38), seguido por el patrón positivo a las pruebas de tuberculina y de IFN γ y negativo a ELISA (n=19). Seis animales fueron positivos a la prueba de tuberculina y negativos a las de IFN- γ y ELISA, mientras que solo 1 animal fue positivo a la prueba de tuberculina y ELISA, pero negativo a la de IFN- γ . En el último patrón se encontró 1 animal, el cual era positivo a la prueba de IFN- γ y de ELISA, pero negativo a la de tuberculina (**Cuadro 2**).

En el **Cuadro 3** se muestra el número de animales que mantuvieron o cambiaron su patrón inmune durante los seis meses de la investigación, tomando en cuenta que 10 bovinos fueron sacrificados en este periodo por necesidades internas del rancho (9 positivos a la prueba de tuberculina, 8 a la de IFN- γ y 3 a ELISA). Mediante la prueba de tuberculina se identificaron 18 (60%) animales que se mantuvieron positivos durante todo el trabajo, 14 (58%) animales con la prueba de IFN- γ y 1 (17%) en la prueba de ELISA.

A partir de los resultados a las pruebas de tuberculina, INF- γ y ELISA, se estimó la prevalencia y la incidencia relativa de la TB durante un periodo de 6 meses, eliminando a los 10 animales sacrificados durante este tiempo. Al primer muestreo se obtuvo una prevalencia relativa del 46% y seis meses después del 44%.

Cuadro 1. Resultados generales de las pruebas realizadas a los 69 bovinos para evaluar su estado inmunológico

N = 69	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%
TUBERCULINA	30	43	39	57
IFN-γ	24	35	45	65
ELISA	6	9	63	91

Cuadro 2. Distribución y porcentaje de los diferentes patrones inmunes obtenidos en las tres pruebas realizadas a los 69 animales estudiados

	Tb*	IFN-γ	ELISA	TOTAL	%
1	-	-	-	38	55
2	+	+	-	19	27.5
3	+	-	-	6	8.6
4	+	+	+	4	5.7
5	+	-	+	1	1.4
6	-	+	+	1	1.4
TOTAL				69	

*Prueba de Tuberculina

Cuadro 3. Número y porcentaje de animales que mantuvieron o cambiaron su perfil inmunológico después de 6 meses de estudio con base a las tres pruebas realizadas.

	N / N ^a			P / P ^b		
	Tb*	IFN- γ	ELISA	Tb	IFN- γ	ELISA
No.	32	39	56	18	14	1
%	82	87	89	60	58	17

* Prueba de Tuberculina

^a Animales que se mantuvieron negativos durante los seis meses de la investigación

^b Animales que se mantuvieron positivos durante los seis meses de la investigación

	N / P ^c			P / N ^d		
	Tb*	IFN- γ	ELISA	Tb	IFN- γ	ELISA
No.	6	4	0	3	2	2
%	15	9	0	10	8	33

**Los resultados corresponden a los 59 animales no sacrificados durante los 6 meses

*Prueba de Tuberculina

^c Animales que cambiaron de negativo a positivo su perfil inmune durante los seis meses de la investigación

^d Animales que cambiaron de positivo a negativo su perfil inmune durante los seis meses de la investigación

La tasa de incidencia relativa fue del 11% en un periodo de 6 meses. Con la finalidad obtener un mejor provecho de la información se determinó si las pruebas inmunológicas medían el mismo parámetro o eran capaces de diferenciar dos tipos de respuesta inmune. Para ello se obtuvo el coeficiente de Cohen's kappa para medir el grado de concordancia entre ellas, siendo de $\kappa=0.68$ para las pruebas de tuberculina e IFN- γ , de $\kappa=0.15$ para las pruebas de ELISA y tuberculina y de $\kappa=0.078$ para ELISA e IFN- γ (**Cuadro 4**).

El patrón de resultados más frecuente en los animales sacrificados con base a la respuesta inmune y a la patología, fue el positivo a las pruebas de tuberculina y de IFN- γ , pero negativo a la prueba de ELISA y a la presencia de lesiones (n=10), seguido con el mismo patrón de las pruebas inmunes, pero con presencia de lesiones al rastro (n=8) (**Cuadro 5**).

7.3 Hallazgos patológicos

En cuanto a los hallazgos patológicos de los bovinos sacrificados las lesiones macroscópicas se clasificaron por su número y tamaño con cruces: + Lesiones de ≤ 5 mm de diámetro y de 1 a 2 lesiones visibles, ++ Lesiones de $\geq 6 \leq 10$ mm y +++ Lesiones múltiples mayores a 10mm. En general, los órganos que presentaron lesiones más frecuentemente fueron los nódulos linfáticos (NL) retrofaríngeos con 5 lesiones con clasificación +++, los NL mediastínicos con el mismo número de lesiones, pero 2 con clasificación +++ y los tres restantes con clasificación +. Los siguientes fueron los NL traqueobronquiales con 3 lesiones de tipo +++, seguidos por los pulmones con 2 lesiones de tipo +++. Los NL hepáticos y mesentéricos solamente presentaron una lesión de tipo +++ cada uno (**Cuadro 6**). Las lesiones en pulmón se localizaron principalmente entre la inserción del lóbulo craneal y el lóbulo medio (lado derecho).

De los 29 animales sacrificados, 12 presentaron lesiones compatibles con la TB. Cuatro animales negativos a todas las pruebas y a la excreción bacteriana (59, 208, 362 y 395) murieron por causas diferentes al programa de erradicación de la TB (fracturas y timpanismo) fueron incluidos como controles negativos (aunque convivían con los animales infectados), y dos de ellos (59 y 208) de 5.8 años de edad y 4 partos y de 5.5 años de edad y tres partos respectivamente, presentaron lesiones de clasificación + en los NL mediastínicos al rastro, perdiéndose la mayoría de las muestras al corte para estudios de histopatología y aislamiento. Las dos vacas restantes de 2 y 2.2 años de edad y de un parto cada una, no presentaron lesiones macro ni microscópicas.

7.4 Lesiones histopatológicas

Las lesiones histopatológicas se clasificaron como: **TIPO I**: lesión temprana, **TIPO II**: transición entre los dos tipos y **TIPO III**: lesiones consolidadas y crónicas. La diferencia más

Cuadro 4. Coeficiente de concordancia (Cohen's *Kappa*) obtenido entre las tres pruebas inmunológicas

PRUEBAS	κ^* N = 69
Tuberculina- IFN- γ	0.68
Tuberculina –ELISA	0.15
IFN- γ - ELISA	0.07

Valor de Cohen's *kappa

Cuadro 5. Distribución y porcentaje de los perfiles inmunológicos y los hallazgos patológicos de los 29 bovinos sacrificados en el estudio

	Tb*	IFN- γ	ELISA	LESIONES	TOTAL	%	IDENTIFICACIÓN
1	+	+	-	-	10	34.4	25,37,127,277,285,289,307,354,315,328
2	+	+	-	+	8	27.6	8,212,213,220,316,249,254,203
3	+	-	-	-	3	10	61,358,376
4	+	+	+	+	2	7	206,529
5	+	+	+	-	2	7	56,351
6	-	-	-	+	2	7	59,208
7	-	-	-	-	2	7	362,395
TOTAL					29		

*Prueba de Tuberculina

Cuadro 6. Hallazgos patológicos, localización y características de las lesiones de los bovinos sacrificados

ANIMAL	RF ¹	TIPO*	Tb ²	TIPO	M ³	TIPO	MS ⁴	TIPO	Hp ⁵	TIPO	P ⁶	TIPO	ZN	EXCRETOR
8 ^a			+++	I, III				II			+++	III	+	+
212					+++	I, II, III					+++	III	+	+
206					+++	I, II, III			+++	III			+	+
220	+++	II	+++	II									+	+
316	+++	I, III											+	+
213 ^b						I, II							+	+
315 ^c													-	+
328 ^c													-	+
529	+++	I, III	+++	III										-
203	+++	III					+++	III					+	-
254	+++	III											+	-
249					+	***							-	-
[§] 59					+	***							-	-
[§] 208					+	***							-	-

¹Rf: LN Retrofaríngeos, ²Tb: LN Traqueobronquiales, ³M: LN Mediastínicos, ⁴Ms: LN Mesentéricos, ⁵Hp: LN Hepáticos, ⁶P: Pulmón.

Clasificación macroscópica de las lesiones: +, ++, +++

* Clasificación de las lesiones histopatológicas: TIPO I, II, III

^aVaca sin lesiones visibles en LN. Mesentérico, pero con lesión de tipo II en Histopatología

^bVaca sin lesiones visibles en L.N. mediastínico

^cVacas excretoras sin lesiones macro y microscópicas

***Lesiones muy pequeñas perdidas al cortar del tejido. Solamente se tienen datos de la tinción de ZN.

[§] Animales que murieron sin causa relacionada con la campaña de TB (fracturas, timpanismo, etc.), utilizados como controles negativos.

importante entre ellas es el grado de infiltrado celular, necrosis, fibrosis y calcificación. De los 5 animales que presentaron lesiones en los NL retrofaríngeos, dos presentaron lesiones mixtas (I y III), mientras que los restantes presentaron lesiones únicas, dos de tipo III y una de tipo II. De los 5 animales con lesiones en los NL mediastínicos, 2 de ellos presentaron lesiones mixtas (I, II, III) y en tres de ellos se perdió la muestra al corte por ser muy pequeña. Tres animales presentaron lesiones en los NL traqueobronquiales, de los cuales, uno tuvo lesiones mixtas (I y III) y los dos restantes con tipo II y III respectivamente (**Cuadro 6**). En cuanto a las lesiones localizadas en pulmón y en NL hepáticos, todas fueron clasificadas de tipo III. Mediante la histopatología se pudo detectar a dos vacas sin lesiones visibles, una de ellas presentó lesiones de tipo II en el NL mesentérico y la otra presentó lesiones de tipo I y II en el NL mediastínico.

7.5 PCR anidada y PCR control

Con el objetivo de identificar animales que estuviesen excretando *M. bovis* por la vía respiratoria, se implementó una PCR anidada para amplificar un segmento del gen que codifica la proteína de secreción **MPB70** en muestras de exudado nasal. La técnica mostró una sensibilidad para detectar desde 5 fg de ADN de cepas de referencias cuantificadas mediante fluorómetro (**Figura 6**), y de 1 pg de ADN cuantificado mediante espectrofotometría (**Figura 7**).

En cuanto a la especificidad (**Figura 8**) se logró la amplificación de los controles positivos, ADN genómico de *M. bovis* cepa AN5 y de *M. tuberculosis* H37Rv, ambos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Asimismo se corroboró la ausencia de amplificación utilizando ADN de *M. avium* cepa D4.

La concentración total de ADN utilizado de cada una de las muestras de exudado nasal (**Figura 9**) fue de 500 ng en un volumen total de 20µl de reacción. Las muestras negativas en la PCR anidada fueron posteriormente sometidas a la PCR que amplifica una región del gen del citocromo b (CyB1 y CyB2), para descartar cualquier tipo de inhibición de la reacción (**Figura 10**). En el caso de 14 muestras de exudado que no amplificaron en esta PCR control, se requirió aumentar la cantidad de ADN hasta 700 ng por reacción. Una vez que amplificaron, se sometieron nuevamente a la PCR anidada para comprobar el resultado (**Figura 11**).

7.6 Características de los animales excretores

Mediante la PCR anidada en exudado nasal se detectaron ocho animales excretores positivos a la prueba de tuberculina y de IFN- γ . Solamente uno fue positivo a la prueba de ELISA, detectándose ADN bacteriano en dos de seis muestras. En cuanto a las lesiones macroscópicas, 5 de los 8 animales presentaron lesiones compatibles a la TB y sólo uno de los

tres animales sin lesiones visibles presentó lesiones histopatológicas. Los dos restantes, no presentaron ningún indicio de lesión macro y microscópica (**Cuadro 7**).

De los animales excretadores (**Cuadro 6 y 7**), la vaca 206 tenía 5.5 años de edad y 4 partos y se le detectó ADN de micobacteria en exudado nasal dos veces (3^{er} y 6^o muestreo), fue positiva a la prueba de tuberculina, IFN- γ y ELISA, y presentó lesiones macroscópicas de clasificación +++ en los NL mediastínicos y hepáticos. La clasificación histopatológica encontrada en cada uno de ellos fue I, II, y II, III respectivamente y fue positiva a la tinción de Zielh Neelsen (ZN) (**Figura 12**).

Los animales 8 y 212 fueron positivos a la prueba de tuberculina y de IFN- γ , pero negativos a la de ELISA, y presentaron lesiones macroscópicas de tipo +++. La primer vaca, de 8.5 años de edad y 4 partos, presentó lesiones en los NL traqueobronquiales y en pulmón. Las clasificaciones histopatológicas fueron de I y III, y III respectivamente. Esta misma vaca, a pesar de no mostrar lesiones macroscópicas en los NL mesentéricos, presentó lesiones histopatológicas de tipo II. A la tinción de ZN, fue positiva y negativa al aislamiento bacteriano. La segunda vaca de 5.2 años de edad y 3 partos, presentó lesiones en los NL mediastínicos y en pulmón, con clasificación histopatológica de tipo I, II y III y III respectivamente, siendo positiva a la tinción ZN y al aislamiento bacteriano, corroborando la tipificación de *M.bovis* a través de las pruebas bioquímicas convencionales.

La vaca 213 de 4.5 años de edad y 3 partos fue positiva la prueba de tuberculina, de IFN- γ y negativa a la de ELISA. No presentó lesiones macroscópicas a la inspección post-mortem, pero mostró lesiones microscópicas en los NL mediastínicos con clasificación de tipo I y II, siendo positiva a la tinción de ZN.

Los animales 220 y 316 de 4.9 años de edad y 2 partos y de 3.9 años con 1 parto respectivamente, fueron positivos a la prueba de tuberculina e IFN- γ , pero negativos a ELISA, y las dos presentaron lesiones macroscópicas de tipo +++ en los NL retrofaríngeos con múltiples lesiones en parénquima, y sólo la vaca 220 presentó lesiones en el NL traqueobronquial. A la tinción de ZN, las dos vacas fueron positivas.

Los animales 328 y 315 de 3.7 años de edad y 2 partos, fueron positivos a la prueba de tuberculina y a la de IFN- γ , pero negativas a ELISA. No presentaron lesiones macro ni microscópicas, y fueron negativas a la tinción de ZN y al aislamiento bacteriano, sin embargo, se detectó ADN bacteriano en el exudado nasal una ocasión.

7.7 Concordancia entre respuesta inmune y excreción bacteriana

En cuanto a la detección de animales excretadores, las pruebas de tuberculina e IFN- γ detectaron el 12% (8/69), mientras que la prueba de ELISA sólo detectó el 2% (1/69). Los coeficientes de Cohen's *kappa* para medir la concordancia entre las pruebas de IFN- γ ,

tuberculina y ELISA con la excreción bacteriana fueron 0.39, 0.29 y 0.04 respectivamente (Cuadro 8).

Así mismo, se evaluaron los coeficientes de Cohen's *kappa* para medir la concordancia entre la patología y las pruebas inmunes, los cuales fueron prácticamente nulos para el caso de las pruebas inmunológicas, mientras que para la excreción bacteriana fue de $\kappa=0.40$ (Cuadro 9).

Cuadro 7. Características importantes de los animales excretadores detectados por medio de la PCR anidada

	ANIMAL	EDAD (años)	Muestreo¹	IFN-γ	DO**	Tb*	mm***	ELISA	DO	LESIONES
1	206	5.5	3 y 6	+	1.742	+	62	+	0.51	si
2	8	8.5	6	+	0.726	+	5	-	0.167	si ^a
3	212	5.25	2	+	3.171	+	9	-	0.252	si ^a
4	213	4.5	5	+	0.396	+	15	-	0.173	si ^b
5	220	4.9	1	+	0.604	+	14	-	0.184	si
6	316	3.9	3	+	0.270	+	4	-	0.144	si
7	328	3.7	6	+	0.249	+	9	-	0.138	no
8	315	3.7	1	+	1.578	+	12	-	0.096	no

¹Número de muestreo en el que fue detectado ADN de la micobacteria

*Prueba de Tuberculina

**Densidad óptica

*** milímetros de la reacción al PPD

^a Lesiones única en pulmón

^b Vaca sin lesiones visibles al rastro, pero con lesiones microscópicas

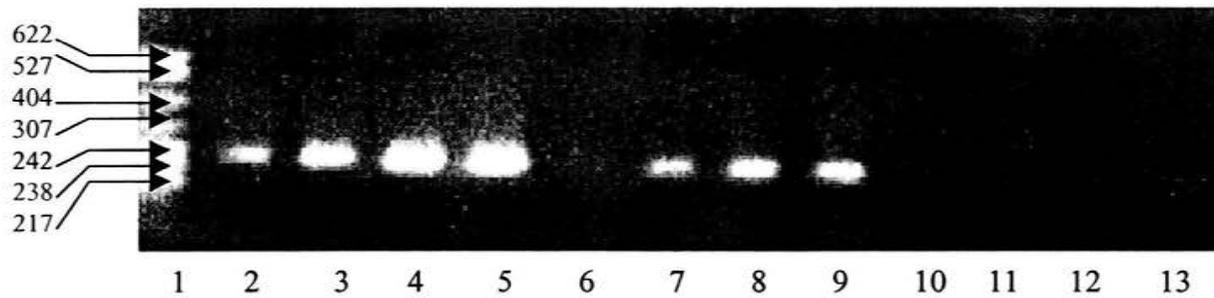


Figura 6. ADN cuantificado mediante Fluorometría para evaluar la sensibilidad de la PCR anidada. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-5: 100, 200, 500 y 1000 mg de cepa *M. bovis* AN5. Carril 6-9: 20,30, 50 y 100 ng de DNA Carril 10-13: 1, 10, 20, 50 pg. Gel de agarosa al 2%.

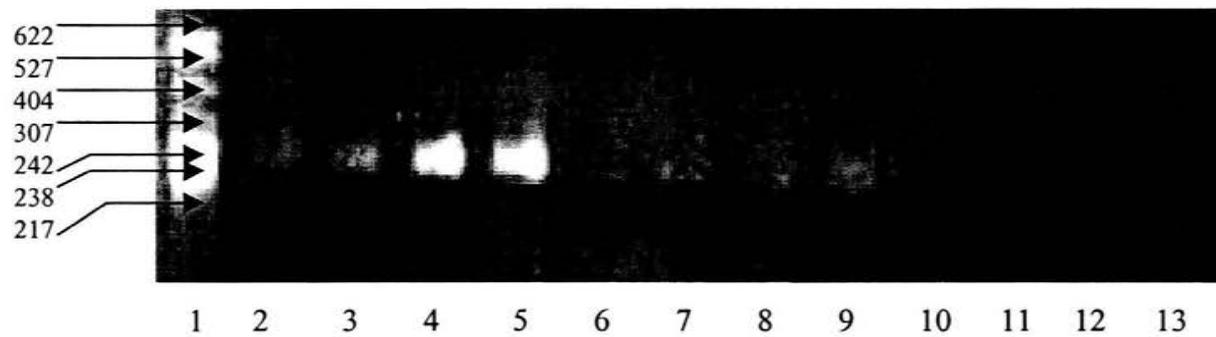


Figura 7. ADN cuantificado mediante Espectrofotometría para evaluar la sensibilidad de la PCR anidada . Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-5: 10,50,100 y 300 ng de ADN de la cepa *M. bovis* AN5. Carril 6-9: 10, 50, 100 y 300 ng Carril 10-12: 10, 5, 1 fg. Carril 13: Agua. Gel de agarosa al 2%.

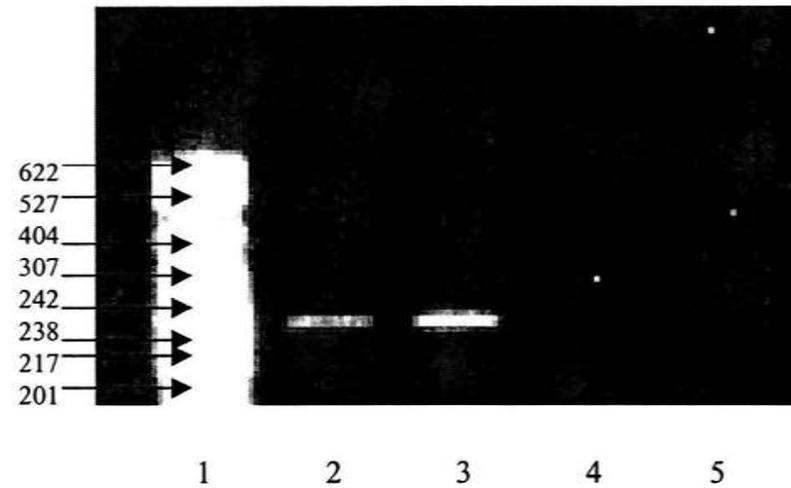


Figura 8. Controles utilizados en la PCR anidada. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2: Cepa *M. bovis* AN5. Carril 3: *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4 : *M. avium* D4. Carril 5: Agua. Gel de agarosa al 2%.

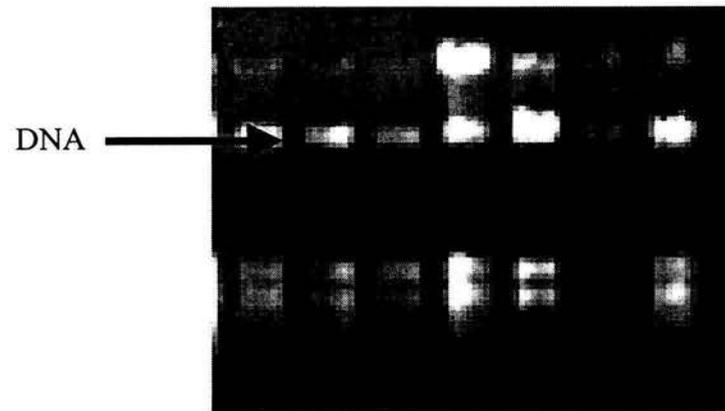


Figura 9. ADN genómico obtenido a partir de muestras de exudado nasal. Gel de agarosa al 0.8%.

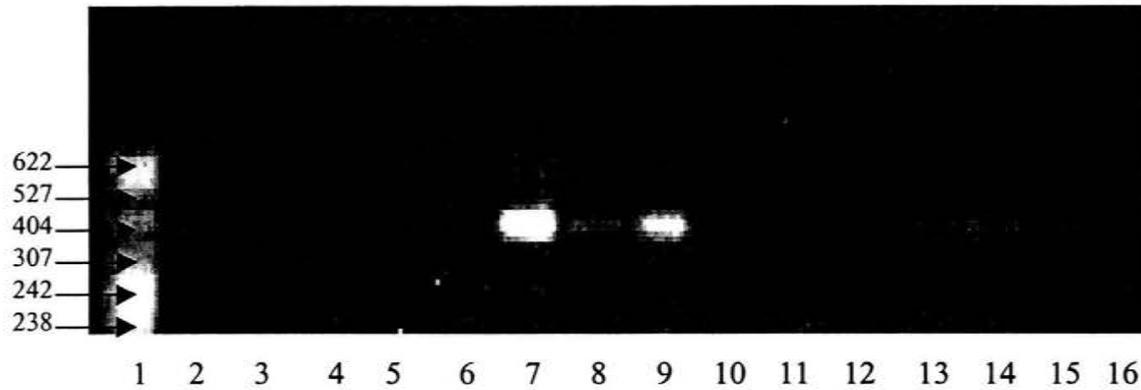


FIGURA 10. Productos de amplificación de 375 pb del gen que codifica el Citocromo b en las muestras de exudado nasal (PCR control). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-15: muestras amplificadas. Carril 16: Agua. Gel de Agarosa al 2%.

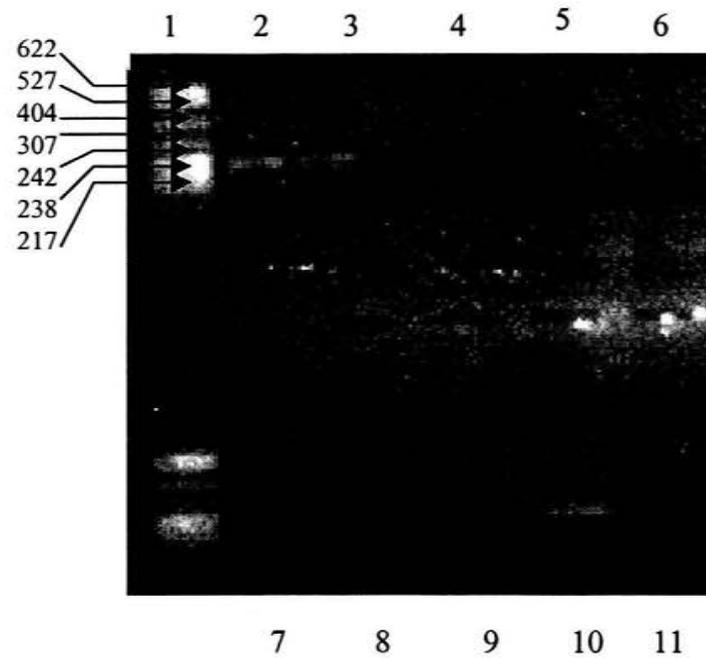


Figura 11. Muestra de exudado nasal positivo a la PCR anidada. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: *M. bovis* AN5. Carril 3: *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4: *M. avium* D4. Carril 5-9: Exudados nasales negativos. Carril 10: Exudado nasal positivo. Carril 11: Agua. Gel de agarosa al 2%.

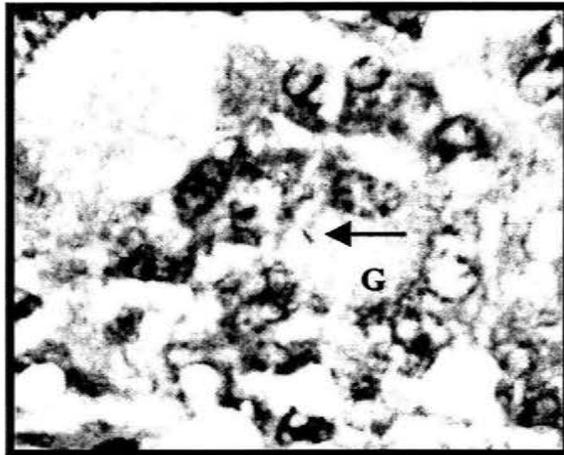


Figura 12. Identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen (100x). Se observa un bacilo dentro de una célula gigante (G).

Cuadro 8. Coeficientes de concordancia (Cohen's *kappa*) obtenidos entre la excreción bacteriana y las pruebas inmunológicas

N = 69	TUBERCULINA		IFN- γ		ELISA	
	+	-	+	-	+	-
Excretores	8 (12)*	0 (0)	8 (12)	0 (0)	1 (2)	7(10)
No excretores	22 (32)	39(56)	16 (23)	45(65)	5 (7)	56(81)
Total	30	39	24	45	6	63
κ^{**}	0.29		0.39		0.04	

* Porcentajes

** Valor de Cohen's *kappa*

Cuadro 9. Coeficientes de concordancia (Cohen's *kappa*) obtenidos entre la patología y las pruebas inmunes

N = 29	TUBERCULINA		IFN- γ		ELISA		EXCRECIÓN	
	+	-	+	-	+	-	+	-
LESIONES	10 (34)*	2 (7)	10 (34)	2 (7)	2 (7)	10 (34)	6 (21)	6 (21)
S/ LESIONES	15 (52)	2 (7)	12 (41)	5 (18)	2 (7)	15 (52)	2 (7)	15 (52)
Total	25	4	22	7	4	25	8	21
κ^{**}	-0.03		0.09		0.04		0.40	

*Porcentajes

**Valor de Cohen's *kappa*

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la excreción de *M. bovis* en bovinos de un hato con una alta prevalencia de TB, y la relación que este fenómeno guarda con algunos parámetros de la respuesta inmune, así como con la presencia de lesiones después del sacrificio. Para ello se implementaron las pruebas de diagnóstico inmunológico de tuberculina IFN- γ y ELISA, y la prueba de PCR anidad específica para identificar ADN de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en exudados nasales.

La prueba de tuberculina simple caudal detectó un mayor número de animales, seguida del IFN- γ y ELISA. El patrón inmune más frecuentemente encontrado en los bovinos con relación a las tres pruebas inmunológicas, fue el negativo a todas (55%) seguido por el patrón positivo a las pruebas de tuberculina e IFN- γ y negativo a la prueba de ELISA (27.5%). No obstante que la tuberculina identificó un mayor número de animales, se considera que la prueba de IFN- γ es más específica (Wood, 2001; Buddle y Col., 1995), debido a que la tuberculina tiene menos poder para discriminar casos falsos positivos sensibilizados con micobacterias atípicas (Monaghan y Col., 1994). Esto se pudo constatar en la diferencia de los 6 animales positivos a la prueba de tuberculina y negativos a la de IFN- γ , en donde 4 de esos animales fueron positivos a *M. avium* en la prueba de IFN- γ .

En este trabajo el número de animales infectados detectados por medio de la prueba de ELISA es bajo, lo cual se atribuye al predominio de la respuesta de tipo celular en los bovinos infectados (Pollock y Col., 2002; Flynn, 2000 y 2001). Así mismo, se considera que existe poca cantidad de micobacterias y de antígenos libres presentes en las lesiones, necesarias para inducir la producción de anticuerpos (Costello y Col., 1997). Actualmente se considera que durante la mayor parte de la infección la carga bacteriana es baja y la respuesta inmune celular predomina; sin embargo, con la progresión de la enfermedad, la carga bacteriana aumenta y la respuesta de tipo humoral comienza a ascender, por lo que la presencia de anticuerpos se hace detectable (Cassidy y Col., 1998; Pollock y Col., 2002). El progreso de la enfermedad quizás se relaciona con una baja respuesta inmune celular, debida

a infecciones virales inmunosupresoras, enfermedades metabólicas, deficiencias alimenticias y al estrés debido al manejo (Monies y Col., 1999; Pollock y Col., 2001),

Únicamente un animal de todos los considerados infectados fue negativo a la tuberculina y positivo a la prueba de ELISA. El uso de esta prueba para la detección de animales anérgicos que no responden a la prueba de tuberculina, ya ha sido reportada anteriormente (Plackett y Col., 1989; Estrada-Chávez y Col., 2001; Díaz y Col., 2003) y es considerada como una herramienta importante para la identificación de estos casos.

Se calcularon la prevalencia y la incidencia relativas con base a las tres pruebas diagnósticas durante los 6 meses de duración del estudio. La prevalencia al inicio del estudio fue del 46% y 6 meses después del 44%, esto eliminando a los animales sacrificados durante este periodo. La incidencia relativa obtenida fue del 11% en 6 meses. Esta cifra se considera dentro del rango común para hatos bajo control de las campañas de la TB (Francis, 1958) en comparación con explotaciones en donde la movilización de ganado es constante o el número de animales es mayor, en los cuales la incidencia relativa puede llegar hasta un 86% (Córdova, 1997; Estrada-Chávez y Col., 1999). En la explotación en donde se realizó el estudio la movilización de animales es nula, por lo que se piensa que la infección respiratoria entre animales es la ruta más importante de transmisión, en comparación con aquellos en que la infección puede provenir de fuentes externas, ya sea por la introducción de animales infectados o por la cercanía de explotaciones contaminadas (Goodchild y Col., 2001).

Con la finalidad de saber si las pruebas de tuberculina e IFN- γ miden el mismo parámetro o son capaces de diferenciar distintos tipos de respuesta inmune, se obtuvo el valor de concordancia entre ellas. En la literatura se ha descrito ampliamente que la prueba de tuberculina mide la HT (Monaghan y Col., 1994; Morrison y Col., 2000), mientras que la prueba de IFN- γ mide indirectamente la respuesta inmune mediada por células (IMC) (Ryan y Col., 2000; Wood, 2001; Walravens y Col., 2002; Dannenberg, 1993). La concordancia obtenida entre las pruebas de tuberculina e IFN- γ ($\kappa=0.68$) demuestra que prácticamente, ambas miden el mismo parámetro de la respuesta inmune mediada por células.

En el caso de la prueba de ELISA, la concordancia obtenida es sumamente baja, $\kappa=0.15$ con la prueba de tuberculina o con la prueba de IFN- γ $\kappa=0.07$. Estos valores son de esperarse ya que ELISA mide la respuesta de tipo humoral (Silva, 2001; Neill y Col., 2001; Lightbody y Col., 1998).

Conforme al esquema de control mediante la prueba de tuberculina y la IP, se sacrificaron 25 reactores a tuberculina, 22 de ellos positivos a IFN- γ y 4 a ELISA. Adicionalmente, se incluyen al estudio cuatro animales negativos a todas las pruebas que murieron por causas ajenas a la campaña. De un total de 29 bovinos sacrificados se detectaron 12 animales con lesiones, uno de ellos únicamente mediante histopatología (No. 213). En cuanto a los animales negativos (No. 59 y 208), se comprobó la presencia de lesiones en dos de ellos.

Las pruebas de tuberculina y de IFN- γ detectaron el 34% de animales con lesiones al rastro (10/29), mientras que la prueba de ELISA sólo al 7%. Esto concuerda con la capacidad de las pruebas de tuberculina e IFN- γ para medir la IMC, así como con su predominancia durante el curso de la TB (Pollock y Col., 2001), a diferencia de la escasa y heterogénea respuesta inmune humoral. En relación la prueba de ELISA, los 4 animales positivos sacrificados, dos de ellos presentaron lesiones al rastro (206 y 529), haciendo hincapié en la relación que existe entre la concentración de anticuerpos circulantes y la presencia de lesiones al rastro (Estrada-Chávez y Col., 2001; Ritacco y Col., 1991)

El 40% de animales infectados en este trabajo presentó lesiones en rastro. Este resultado se considera bajo en comparación al obtenido por Estrada-Chávez (1995), el cual encontró que el 67% de animales provenientes de un hato de alta prevalencia presentaba lesiones.

Se considera que en explotaciones en las que no se ha realizado ningún tipo de control y saneamiento de la TB, es posible encontrar hasta un 90% de animales infectados con lesiones en nódulos linfoides asociados al tracto respiratorio, y hasta un 64% de animales con un foco primario en el tejido pulmonar. Conforme la prevalencia disminuye y es establecido un

programa de control de la TB, el porcentaje de animales con lesiones a la IP se reduce (Estrada-Chávez, 1995; Wilesmith y Col., 1987).

Los órganos más frecuentemente afectados fueron en orden descendente: los NL mediastínicos (50%), retrofaríngeos (42%), traqueobronquiales (25%), el pulmón (17%) y por último los nódulos mesentéricos (8%) y hepáticos (8%). El 50% de los animales presentaron lesiones en un solo órgano (6/12), mientras que el otro 50% presentó lesiones en diferentes localizaciones. La presencia de lesiones en NL asociados al tracto respiratorio ha sido descrita en diversos trabajos y se considera característica de la TB, ya que del 23% al 32% de los animales tuberculosos las presentan (Estrada-Chávez, 1995; Whipple y Col., 1996; Corner, 1994; Neill y Col., 1994).

La frecuencia y localización de las lesiones en este estudio se asemeja a lo reportado por otros autores, los cuales han encontrado que los NL más afectados son los relacionados con la cavidad torácica y en segundo lugar, están representados los NL asociados al tracto respiratorio superior o de la cabeza (Neill y Col., 2001; Menzies y Col., 2000). Con respecto a este último punto, recientemente han sido descritas las lesiones en tonsilas, sugiriendo otra ruta de infección vía nasofaringe y orofaringe (Cassidy y Col., 1999), pudiendo explicar porque en 2 de los 5 casos de animales con lesiones en NL retrofaríngeos las lesiones estaban confinadas a este órgano en particular.

En el caso de la presencia de lesiones en los NL hepáticos y mesentéricos podrían ser un indicio de una infección diseminada a partir del foco primario (Goodchild y Col., 2001), así como de infecciones congénitas, las cuales son poco frecuentes (Francis, 1958; Cantwell, 1994).

Por otro lado, el 60% (15/25) de los animales sacrificados reactivos a la prueba de tuberculina no tuvieron lesiones visibles, pero la mayoría (12/15) fueron también positivos a la prueba de IFN- γ . La ausencia de lesiones visibles también sugiere que la infección era reciente en estos animales, ya que además se sabe que la prueba de IFN- γ detecta animales infectados más tempranamente que la prueba de tuberculina (Wood, 2001; Buddle y Col., 1995; Ryan y Col., 2000). También es posible que los animales reactivos a la tuberculina y positivos a la

prueba de IFN- γ pero sin lesiones visibles al sacrificio, podrían cursar con un estado de infección latente, originado por la respuesta IMC, la cual puede limitar la infección, impidiendo o induciendo la reversión de lesiones (Kaufmann, 1995; Pollock y Col., 2002).

No obstante, otra posibilidad es que las lesiones hayan sido muy pequeñas como para observarse a simple vista, recordando que la IP está sujeta al error (Corner, 1994) aunado a la dificultad para analizar mediante histopatología una gran proporción de tejidos sospechosos (McIlroy, 1986; Duffield y Col., 1989).

Con respecto a los animales negativos a las tres pruebas que presentaron lesiones granulomatosas localizadas en los NL mediastínicos, estas lesiones eran únicas y pequeñas (< 2 mm de diámetro) debido a lo cual, se perdió gran parte del tejido durante la IP. La probabilidad de que se tratara de una etiología diferente a *M. bovis* se considera escasa debido a los antecedentes del hato, de donde la bacteria ha sido aislada previamente y a lo característico de las lesiones. Una posible explicación es que los animales estuvieran resolviendo la enfermedad, eliminando la bacteria del organismo y evitando el progreso de la lesión, al no presentar reacción a ninguna de las pruebas (Neill y Col., 2001).

No obstante, no se debe descartar que estos animales estuvieran en un estado de latencia, en donde el bacilo se haya controlado, pero resalta la ausencia de memoria inmunológica. Algunos autores sugieren la presencia de antígeno como requisito indispensable, para mantener la memoria inmune del tipo celular (Andersen y Col., 1993 y 1995; Sprent y Col., 1994), pero se desconoce el tiempo que requiere dicha memoria en desaparecer, y probablemente dependerá de diversos factores como la dosis de infección, la sensibilización con antígenos compartidos con otras especies de micobacterias (atípicas) y factores genéticos del hospedero (Andersen y Col., 1994; Neill y Col., 1992; Buddle y Col., 2002).

En cuanto al diagnóstico bacteriológico, sólo fue posible aislar la bacteria en un solo animal (Vaca 212), a pesar de la presencia de lesiones en algunos animales reactivos y la presencia de bacilos en la tinción de Zielh-Neelsen. Se sabe que el aislamiento bacteriano del género *Mycobacterium spp* es difícil de realizar, además de requerir de por lo menos 10^3 bacilos por ml de muestra procesada para asegurar su crecimiento (Campuzano, 1999). Para la

conservación de las muestras se utilizó el borato de sodio al 6%, lo cual es recomendable para mantener la viabilidad bacteriana (Milián y Col., 2000). Es posible que las muestras que se obtuvieron hayan tenido poca cantidad de bacterias viables, debido al diverso grado de calcificación en las lesiones, o bien, no se deben de descartar algún tipo de error durante el procedimiento.

Es pertinente resaltar la importancia de la histopatología para el diagnóstico y control de la TB. En este trabajo se encontraron 2 casos con lesiones microscópicas sin lesiones macroscópicas. Uno de ellos solo presentó lesiones (No. 213) del tipo I y II en el NL mediastínico. Otro animal presentó lesiones macroscópicas en algunos órganos (No.8), pero en el nódulo mesentérico solo tuvo una lesión microscópica, clasificada como de tipo II. Debido a lo anterior, algunos autores han señalado el carácter indispensable de la histopatología en el diagnóstico (Corner, 1994; McIlroy, 1986). Se ha reportado la presencia de lesiones en NL mesentéricos, los cuales pudieran derivarse de un foco primario en pulmón u otro órgano diferente (Francis, 1958; Dannenberg, 1993), o bien por la ingestión de las micobacterias. Sin embargo, para que la infección vía oral se desarrolle son requeridas grandes cantidades de bacilos (Morris, 1994; Morrison, 2000; Menzies y Col., 2000).

Algunos animales reactivos a la prueba de tuberculina y positivos a la prueba de IFN- γ sin lesiones visibles, presentaron activación de los centros germinativos, cambios vasculares como congestión y hemorragia, sugiriendo quizá el inicio de un proceso inflamatorio poco confirmativo para los fines de este trabajo.

Algunas de las lesiones microscópicas mostraron la presencia importante de un infiltrado polimorfonuclear. Se sabe que los neutrófilos son atraídos al sitio de lesión por la acción quimiotáctica de la IL-8 y TNF- α , y que juegan un papel importante en la etapa inicial de la patología y en la formación del granuloma (Cassidy y Col., 1998 y 1999).

Para los estudios moleculares de los exudados nasales se purificó ADN de estas muestras y de cepas de referencia utilizadas como controles positivos y se cuantificaron por espectrofotometría y fluorimetría. En este último caso, se utilizó un reactivo con alta afinidad por ADN de doble cadena, eliminando así la probabilidad de error al medir la cantidad de

proteínas, lípidos y ADN de cadena simple, a diferencia como sucede con el espectrofotómetro (Ausubel, 1999). Utilizando ADN obtenido de las cepas de referencia cuantificado mediante espectrofotometría, se demostró la posibilidad de detectar mediante la prueba de PCR anidada hasta 5 fg de ADN de *M. bovis*, equivalentes a 1 genoma de la micobacteria. Esta sensibilidad se asemeja a la ya antes obtenida en diversos trabajos, los cuales reportan una sensibilidad de hasta menos de un genoma (Vitale y Col., 1998; Bascunana y Col., 1996; Wards y Col., 1995).

Por otra parte, cuando se utilizó el ADN cuantificado mediante Fluorometría, la sensibilidad fue de 1 pg, cantidad equivalente a 250 genomas. Los presentes resultados señalan la necesidad de definir con una mayor precisión la sensibilidad, utilizando métodos igualmente más precisos y específicos para cuantificar ADN.

La especificidad de la prueba de PCR se considera adecuada para realizar investigaciones epidemiológicas, debido a que se demostró la ausencia de amplificación del producto esperado cuando se utilizó ADN aislado de *M. avium*. Por otro lado, al someter las muestras de exudado nasal a una PCR control para amplificar un producto de 375 pb del Citocromo b del ADN mitocondrial, se descartaron inhibiciones en la reacción de la PCR, contribuyendo a la fidelidad de los resultados (BioTechniques, 1996).

En diversos trabajos se ha descrito la presencia de *M. bovis* en exudados nasales de bovinos infectados tanto experimentalmente (Neill y Col., 1988, 1989, 1991, 1994; Ritacco y Col., 1991; Cassidy, 1999), como de campo (O'Reilly, 1988; McIlroy, 1986; de Kantor, 1978; Costello, 1998; Vitale y Col., 1998), utilizando tanto el aislamiento directo, como pruebas moleculares. Por medio de la PCR anidada, se observó que el 12% (8/69) de animales en esta explotación son excretores de *M. bovis*, lo cual se asemeja a lo reportado por diversos investigadores: 6% (Rempt, 1954), 9.3% (de Kantor, 1978), 15.6% (Krishnaswamy y Col., 1974), 19% (McIlroy, 1986) y 20% (Neill y Col., 1988). Asimismo, mediante métodos moleculares, se ha demostrado que hasta un 30% de los animales tuberculosos son fuente diseminadora de la TB a través del tracto respiratorio (Vitale y col., 1998). En este último trabajo se utilizó una PCR anidada y posteriormente una hibridación, presentando una

sensibilidad desde 1 fg (0.2 genomas de *M. bovis*), mientras que en los otros trabajos, se utilizó el aislamiento bacteriano para confirmarlo.

El hecho de que el 73% (22/30) de los animales reactivos a la tuberculina y el 66% (16/24) de los animales positivos a IFN- γ no fueran detectados con la PCR anidada, no quiere decir que no sean excretores o que mediante la PCR anidada no hayan sido detectados. Se sabe que la excreción de la micobacteria es intermitente, pudiéndose haber perdido un evento de excreción bacteriana durante la cual no se tomó muestra. Neill (1992), demostró que bajas dosis infectivas no causan la enfermedad, ni el desarrollo de lesiones visibles al sacrificio. Sin embargo, la excreción puede volverse intermitente hasta 100 días después de la inoculación.

En este trabajo se detectaron 8 animales excretores a través de la PCR anidada implementada, los cuales tenían la bacteria de manera abundante en fosas nasales, si se toma en cuenta la sensibilidad obtenida por fluorometría. Sin embargo, si tomamos en cuenta la sensibilidad obtenida mediante espectrofotometría, los animales excretores al menos estaban eliminando una bacteria. Las muestras se tomaron a intervalos de un mes lo que sugiere que el periodo de excreción está dentro de un rango de 30 días. Se ha reportado que los periodos entre excreciones intermitentes pueden variar entre 6 a 25 semanas, pero no se deben descartar la presencia de factores epidemiológicos que pueden acortar o alargar dichos periodos (Menzies, 2000).

Todos los animales considerados como excretores eran mayores de 2 años, periodo en el cual se considera que los animales son afectados más frecuentemente (Milián y col., 2000) y que en un hato de alta prevalencia explotado bajo condiciones intensivas, la probabilidad de que la infección haya sido establecida en los individuos es alta (Francis, 1958), a diferencia de aquellos hatos bajo un esquema de pastoreo. Mediante infecciones experimentales se ha sugerido que la excreción se vuelve intermitente después de un lapso de 10 a 60 días de aislamiento constante del bacilo (Menzies y col., 2000). Sin embargo, existen diversos factores que pudieran hacer variar estos resultados y que difieran de las infecciones naturales.

La explotación en donde se realizó el estudio opera bajo un sistema semi-intensivo, en donde las hembras al alcanzar 100Kg de peso vivo son adaptadas a un método de pastoreo

rotativo, y al parir a una edad de 2 años son incorporadas al hato de vacas productoras, en donde conviven con animales de diferentes edades, estratos y condiciones. Por lo tanto, se pensaría que estos animales alcanzan su madurez sin infectarse (Francis, 1958).

Las pruebas de tuberculina y de IFN- γ identificaron como infectados a los 8 animales excretores, sin embargo, dos de ellos no presentaron lesiones a la IP en comparación con los 6 animales restantes. Uno de los animales excretores fue también positivo en la prueba de ELISA, siendo además el único a partir del cual se logró detectar ADN de *M. bovis* en dos muestreos. La utilización de la prueba de ELISA como herramienta en la detección de animales excretores ha sido sugerida por Ritacco y Col. (1991), en donde se observó que algunos animales tuberculosos que excretaban *M. bovis* presentaban altos niveles de anticuerpos.

En este trabajo, el animal excretor positivo a ELISA presentó lesiones en diferentes NL (hepáticos) en comparación con los demás animales. La producción de anticuerpos está asociada a la TB pulmonar y/o a TB diseminada (Plackett y Col., 1989; Amadori y Col., 1998), y lo contrario (lesiones localizadas) se observa con la producción de IFN- γ (Ritacco, 1991). La ausencia relativa de anticuerpos en 7 de los 8 animales excretores y la respuesta positiva a las pruebas de IFN- γ y tuberculina en estos mismos animales, sugieren la importancia de la IMC en el control de la diseminación y excreción de *M. bovis* (Neill y Col., 1994; Ritacco y Col., 1991).

Los resultados del presente trabajo confirman que la excreción de *M. bovis* es una característica del ganado infectado en condiciones de campo, como ha sido mencionado anteriormente en diversos trabajos (Costello y Col., 1998). Debido a que se encontró que un 26% de animales infectados eran excretores, así como a la alta prevalencia (46%) de TB en el hato de estudio, se sugiere que la excreción intermitente de la bacteria influye de manera importante tanto en la diseminación de la enfermedad, como con el mantenimiento y cronicidad de la misma (Morrison y Col., 2000). Las infecciones debido al contacto entre bovinos infectados que estén excretando la micobacteria y animales susceptibles no es el único mecanismo a través del cual se puede favorecer la diseminación de la TB, ya que las re-infecciones endógenas, debido a la diseminación del foco primario, pueden permitir el progreso de la enfermedad en animales que inicialmente estaban controlando la infección.

Los principales NL afectados en los animales excretores fueron los NL mediastínicos, NL retrofaríngeos, NL traqueobronquiales y NL hepáticos. Los animales con lesiones pulmonares son considerados como casos abiertos importantes en la epidemiología y transmisión de la TB, aunque en general se reporta que solo del 1% al 2% de los animales tuberculosos presentan lesiones pulmonares (Neill y Col., 1988, 1991, 1994, 2001) y que menos del 15% del ganado tuberculoso los presenta (Morrison, 2000). Se reportaron 2 de 25 (8%) animales reactivos a la prueba de tuberculina con lesiones pulmonares, a pesar de la revisión exhaustiva realizada en éste órgano. No obstante se ha propuesto que una revisión detenida del tejido pulmonar, realizando cortes de 5 mm de grosor, permite detectar desde un 76% a un 89% de animales tuberculosos con lesiones pulmonares (McIlroy, 1986; Stamp, 1948).

De los 8 animales excretores, 2 (No. 315 y 328) no presentaron lesiones visibles. Esta característica ya ha sido reportada anteriormente (Neill y Col., 1988 y 1992), y aunque se ha mencionado que solo los casos abiertos de TB pueden ser importantes en la transmisión de la enfermedad (McIlroy, 1986; Goodchild y Col., 2001), se ha comprobado la transmisión de la TB de animales infectados naturalmente a animales en contacto, sin presentar lesiones pulmonares o ser casos abiertos (Neill y Col., 1992; Costello, 1998). Neill (1994), logró aislar *M. bovis* en 7 de 15 animales de diferentes nódulos sin lesiones visibles, los cuales eran positivos a la prueba de IFN- γ y carecían de una lesión primaria en pulmón.

Recientemente, se ha señalado la importancia que juegan las vías respiratorias altas en la patogenia de la enfermedad. Diversos estudios han demostrado de la presencia de lesiones microscópicas en la superficie de la mucosa nasal, faringe y tonsilas en animales infectados (Neill y Col., 1988 y 1992) y animales reactivos naturalmente (Cassidy, 1999b), así como también el aislamiento de *M. bovis* a partir del tracto respiratorio superior de animales sin lesiones visibles, hasta en un 15% de los casos (McIlroy, 1986; Cassidy y Col, 1998 y 1999; Costello, 1998; Neill, 1988). Esto puede sugerir la presencia del foco primario, de donde probablemente se libera la bacteria, en un órgano diferente al pulmón, ya sea un nódulo

linfoide asociado al tracto respiratorio superior y que sobretodo drene a la cavidad nasal y faringe (Neill y Col., 1988).

Si el aislamiento de *M. bovis* proviene de exudado nasal de animales negativos al PPD, se puede pensar que la bacteria sobrevive en humedad y en ambiente oscuro dentro de la cavidad nasal o en asociación con la superficie de la mucosa y no establecer la infección (Neill y Col., 1992). Sin embargo, en este trabajo se observó que los animales excretores sin lesiones, desarrollaron una reacción al PPD y una positividad a la prueba de IFN- γ , lo que indica que existió una interacción entre la bacteria y el sistema inmune del hospedero.

En cuanto a la histopatología en los animales excretores, 5 de los 8 excretores presentaron lesiones de tipo I (lesiones recientes) y II (en transición) junto con lesiones de tipo III (lesiones viejas) principalmente en NL asociados al tracto respiratorio. Esto pudiera sugerir que en estos animales la enfermedad se encontraba activa, o bien, que existió una diseminación del foco primario. Estudios realizados sobre la patogénesis de la tuberculosis a mediados del siglo, han demostrado que las lesiones tuberculosas se comportan de forma independiente, de manera que mientras unas se encuentran en el inicio de la formación del granuloma (Tipo I), otras presentan un mayor grado de avance (Tipo II), mostrando una mayor área de necrosis, calcificación y encapsulamiento fibroso (Tipo III).

Por otra parte, las lesiones pulmonares de los animales excretores se caracterizaron por ser de tipo III o lesiones crónicas (No. 8 y 212), las cuales posiblemente fueron focos primarios. La vaca 213 presentó lesiones tipo II en NL mediastínicos a pesar de no presentar lesiones macroscópicas. La presencia de lesiones tipo I y II en diferentes NL asociados al tracto respiratorio, resalta la importancia del potencial de un animal para ser excretor, ya que estas lesiones presentaban poco o ningún grado de calcificación y son consideradas como tempranas.

La concordancia entre las tres pruebas inmunológicas y la excreción bacteriana fue mayor para las pruebas de IFN- γ ($\kappa= 0.39$) y tuberculina ($\kappa=0.29$) en comparación con la obtenida con la prueba de ELISA ($\kappa=0.04$). Estos resultados muestran de alguna manera la posible relación de la respuesta inmune del bovino con la excreción bacteriana.

Los valores de concordancia obtenidos entre las pruebas de tuberculina, IFN- γ y ELISA con la patología fueron prácticamente nulos. La concordancia obtenida entre la excreción bacteriana y la patología fue de $\kappa=0.4$, que aunque no es un valor elevado, es relativamente significativo para mostrar que la presencia de lesiones está asociada con la excreción bacteriana (McIlroy, 1986), aunque no todos los animales excretores presentan lesiones visibles (Neill y Col., 1988, 1994a, 1994b). Por el contrario, el valor de concordancia obtenido entre la prueba de ELISA y la excreción bacteriana es bajo ($\kappa=0.048$), probablemente por que esta prueba mide la respuesta de tipo humoral, la cual es escasa durante la enfermedad (Pollock y Col., 2000). Tomando en cuenta que el tamaño de muestra es pequeño y que el número de animales con lesiones es bajo, se deberán realizar estudios más extensos para corroborar los resultados obtenidos.

Los ocho animales excretores fueron positivos a la prueba de tuberculina y a la de IFN- γ , mostrando la importancia en la relación del estado inmune del animal con la excreción bacteriana en donde ciertos factores como la destrucción de tejidos por la HT, presencia de enzimas proteolíticas, la producción de TNF- α , radicales libres de oxígeno y nitrógeno derivados principalmente de macrófagos, complejos antígeno anticuerpos, factores del complemento, productos tóxicos derivados del bacilo (Lipoarabinomanana y péptido glicanos) y una exacerbada HT con una IMC deficiente, podrían provocar la licuefacción del centro calcificado del granuloma en donde la multiplicación bacteriana se encontraba controlada. La licuefacción del granuloma crea un medio ideal para que la micobacteria se comience a multiplicar extracelularmente, contribuyendo de esta manera a la diseminación (Fenton y Col., 1996; Dannenberg, 1993).

La respuesta mediada por células puede provocar la lisis celular (Jiménez y Col., 2001; García-Sancho y Col., 2001; Flynn, 2001 y 2001; Orme, 2000; Neill y Col., 2001) o bien, la apoptosis de macrófagos infectados con la consecuente liberación de la bacteria (Silva y Col., 2001).

La principal diferencia entre estos dos procesos son, que la HT contribuye a la destrucción de los macrófagos infectados y de macrófagos aún no activados en los cuales se

multiplican las micobacterias con facilidad (Fenton y Col., 1996; Dannenberg, 1991 y 1993), mientras que la IMC activa los macrófagos a través de citocinas específicas para destruir la bacteria eficientemente (Jiménez y Col., 2001; Orme, 2000; Flynn, 2000 y 2001). El desarrollo de ambos procesos es indispensable en la inmunidad contra la TB.

La necrosis tisular inducida por la respuesta inmune predominante durante la TB al parecer contribuye con la liberación y excreción de la micobacteria. Sin embargo, no se deben de olvidar los factores epidemiológicos que pueden inducir un desequilibrio entre la IMC y la HT, entre los que se encuentran el efecto del estrés por las diferentes prácticas de manejo en una explotación (Griffin y Col., 1993), la utilización de tratamientos con corticoesteroides (Doherty y Col., 1995), gestación avanzada e inmunosupresión relacionada con el parto (Buddle y Col., 1994), mala alimentación (Doherty y Col., 1996), etc. Así mismo, la presencia de enfermedades virales inmunosupresoras, como diarrea viral bovina (Pollock y Col., 2002) y Leucosis bovina (Menzies y Col., 2000), pudieran intervenir para que este fenómeno se presente, tal como lo descrito por HIV en humanos (Flynn, 2002).

En modelos murinos, se sabe que el estado de latencia de la micobacteria está asociada con un patrón de producción de citocinas de tipo 1 (IFN- γ e IL-2), mientras que la reactivación se asocia a un cambio en el patrón de tipo 2 (IL-4 e IL-10), ocasionado por el efecto de los corticoesteroides producidos durante el estrés (Howard y Col., 1999). Sin embargo, se requiere de un mayor número de investigaciones que relacionen el efecto de estos factores sobre la persistencia y excreción de *M. bovis* en un modelo bovino.

También no se deben de olvidar factores epidemiológicos como son la función zootécnica, la etapa productiva de los animales, el sexo, la edad, la raza, la jerarquía dentro del hato, las prácticas zootécnicas, el tamaño del hato, la densidad de población, las instalaciones (hacinamiento y deficientes prácticas de limpieza), etc., que pudieran también intervenir en este proceso (Goodchild y Col., 2001; Barlow y Col., 1998; Griffin y Col., 1993; Dionisio, 1997).

9. CONCLUSIONES

- El presente trabajo permitió reforzar la importancia que tienen los animales excretores en la transmisión y persistencia de la TB.
- La utilización de métodos moleculares como la PCR anidada, pueden ser herramientas útiles altamente sensibles y específicas en la detección de animales que estén diseminando la enfermedad, con la finalidad de controlar la TB en una explotación.
- Los valores de concordancia obtenidos entre la excreción bacteriana y la respuesta inmune específica, mostraron una baja, pero significativa relación entre el sistema inmune del bovino y la excreción de la bacteria, tal como se ha descrito en el humano, sin olvidar la diversa gama de factores epidemiológicos que pueden favorecer su presentación.
- Fue posible observar una cierta relación entre la presencia de lesiones al rastro y la excreción bacteriana. Sin embargo, se demostró la presencia de animales excretores sin lesiones visibles a la IP. Este hallazgo es de suma importancia, ya que estos animales pueden estar diseminando la enfermedad, colaborando con la persistencia de la TB en un hato.
- Se requieren futuras investigaciones, las cuales midan la relación que existe entre los diversos factores epidemiológicos como el medio ambiente, nutrición, estrés, manejo zootécnico, entre otros, con la excreción de *M. bovis*.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1. E L I S A (PRUEBA INMUNO ENZIMÁTICA)

1. Se sensibilizaron las placas de poliestireno de 96 pozos (*MaxiSorp™ surface, Nunc-Immuno™ plate*) con 100µl de cada antígeno a una concentración final de 1µg/pozo con buffer de carbonatos pH 9.6.
2. Se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y se descartó la solución al día siguiente.
3. Se añadieron 100µl de la solución bloqueadora por pozo y se incubaron durante 1 hora.
4. Se realizaron dos lavados a cada placa con una solución de lavado por 5 minutos cada uno.
5. Se añadieron 100µl de cada suero problema diluido 1:100 (diluido en solución bloqueadora) y se incubaron las placas 1 hora a 37°C.
6. Se realizaron 5 lavados
7. Se agregaron a todos los pozos 100µl de proteína G conjugada con peroxidasa (*SIGMA, lab. Co.*) a una dilución de 1:10,000 en solución bloqueadora y se incubaron las placas a 37°C durante una hora.
8. Se realizaron 5 lavados.
9. Se añadieron a cada pozo 100µl de solución de revelado.
10. Se paró la reacción a los 10 minutos con la adición de 50µl por pozo de solución de paro.
11. Se utilizó el lector de ELISA (*Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer, BIO-RAD*) y se leyeron las densidades ópticas de las placas a con un filtro de 492 nm.

10.2 Anexo 2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

1. Se exprimieron los hisopos cuidadosamente en las paredes de los tubos llenos de PBS 1x y posteriormente se homogeneizó la solución.
2. Se centrifugaron (*Eppendorf Centrifuge 5415D*) 500µl de la muestra a 12,000 r.p.m. por 5 minutos.
3. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no tirar el sedimento y posteriormente se agregaron 400 µl de TE 1X al sedimento.
4. Se adicionaron 50 µl de lisozima (*SIGMA*) a una concentración de 10mg/ml, se agitó la muestra y se incubó a 37°C durante una hora.
5. Se adicionaron 75 µl de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%/ proteinasa K (*SIGMA*) a una concentración de 20mg/ml (70µl de SDS al 10% y 5µl de proteinasa K), se agitó la muestra y se incubó a 65°C por 10 minutos.
6. Se adicionaron 100µl de NaCl 5 M.
7. Se adicionaron 100µl de CTAB (Hexadecyl trimethyl amonium bromide) /NaCl previamente precalentada a 65°C. Se agitó el tubo hasta que la muestra tomó una consistencia lechosa y se incubó a 65°C por 10 minutos.
8. Se adicionaron 75µl de una solución cloroformo/isoamílico (1:24) hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos.
9. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo (aproximadamente 600µl), teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia para evitar contaminación del ADN.
10. Se adicionaron 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico (360µl aproximadamente) para precipitar los ácidos nucleicos.
11. Se dejó la mezcla a -20°C durante 30 minutos o bien, toda la noche.
12. Se centrifugaron los tubos a 12,000 g durante 15 minutos.
13. Se descartó la mayoría del sobrenadante, dejando aproximadamente 20µl por encima del botón de ADN.
14. Se adicionó 1 ml de etanol al 70% frío (almacenado a -20°C previo a su uso).
15. Se centrifugaron las muestras a 12,000 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejaron aproximadamente 20µl por encima del ADN.
16. Se centrifugo por última vez a 12,000 g durante 1 minuto y se descartó cuidadosamente el sobrenadante.
17. Se secó el ADN en una centrífuga (*Eppendorf Vacufuge™*) por 20 minutos a 45 °C.
18. Se disolvió el ADN en 50µl de amortiguador TE 1X para ser almacenado a una temperatura de -20°C previo a su uso.

19. Se visualizó la presencia de ADN en un gel de electroforesis de agarosa-TAE 1X al 1% teñido con bromuro de etidio (10mg/ml), utilizando 2 μ l de cada una de las muestras extraídas.

10. 3 Anexo 3. Características más importantes de las reacciones en cadena de la polimerasa (anidada y control) utilizadas en la investigación.

Oligos	Secuencia	Región Amplificada	Pares de bases	Concentración de Magnesio	Ciclos	Condiciones
TB1F Y TB1R	TB1-F 5'GAACAATCC GGAGTTGACA A3' TB1-R 5'AGCACGCTG TCAATCATGTA 3'	MPB70	372	2.5 mM	13	94°C 45", 58°C 60", 72°C 60"
M22/3 Y M22/4	M22/3 5'GCTGACGGC TGCACTGTCG GGC3' M22/4 5'CGTTGGCCG GGCTGGTTTG GCC3'	MPB70	208	2.5mM	24	94°C 30", 68°C 30", 72°C 30"
CyB1 y CyB2	CyB1 5'CCATCCAAC ATCTCAGCATG ATGAAA3' CyB2 5'GCCCCTCAG AATGATATTTG TCCTCA3'	Citocromo b	375	2.5mM	34	94°C 30", 58°C 40", 72°C 30"

11. APÉNDICE DE REACTIVOS UTILIZADOS

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Buffer de carbonatos pH 9.6

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	1.59 gr
Bicarbonato de sodio (Na_2HCO_3)	2.93 gr
Agua destilada	1000 ml

Buffer de citratos pH 4.5

Citrato de sodio 0.1M	14.7 gr
Ácido cítrico 0.1M	10.5 gr
Agua destilada	500 ml

Preparar por separado la cantidad deseada. Adicionar el citrato de sodio al ácido cítrico hasta ajustar el pH a 4.5.

Buffer de corrimiento (azul)

Agua destilada	6.5 ml
Azul de bromofenol	25 mg
Xilen	25 mg

Agitar hasta disolver y adicionar 7 ml de glicerol.

Cloroformo/alcohol isoamílico (1:24)

Cloroformo	96 ml
Alcohol isoamílico	4ml

CTAB/NaCl

Cloruro de sodio (NaCl)	4.1 gr
CTAB	10 gr
Agua destilada	100 ml

Disolver a 65°C. NO esterilizar en autoclave.

NaCl 5M

NaCl	146.1 gr
Agua destilada	500 ml

Esterilizar en autoclave.

PBS (Buffer de fosfatos) 1X

Cloruro de sodio (NaCl)	8 gr
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 gr
Fosfato de sodio (Na_2HPO_4)	1.15 gr
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	0.2 gr
Agua destilada	800 ml

Ajustar el pH a 7.3 y aforar a 1000 ml

SDS 10%

Duodecil sulfato de sodio (SDS)	10 gr
Agua destilada	90 ml

Calentar a 68°C para disolverlo. Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 100 ml. Filtrar con membrana de 0.2 μm .

NO refrigerar.

Solución bloqueadora

2% de leche descremada en PBS 1X y 0.05% de Tween 20

Solución de lavado

PBS 1X con 0.05% Tween

Solución de revelado

10ml de buffer de citratos pH 4.5/placa, adicionando 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD) por placa y se agregan en el momento 4 μ l de agua oxigenada.

Solución de paro

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M 55.5 ml
Agua destilada 500 ml

TAE 10X

Disolver:

Tris base 48.4 gr
Agua destilada 800 ml

Agregar:

Ácido acético glacial 11.4 ml
EDTA (200 mM pH 8.0)^a 50 ml
Aforar con agua destilada a 1000 ml

^aEDTA 200mM pH 8.0

EDTA 7.45 gr
Agua destilada 80 ml

Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

TE 1X

Tris base 1.21 gr
EDTA (sal sódica) 0.372 gr
Agua destilada 800 ml
Ajustar pH a 7.4-7.6 y aforar a 1000 ml
Esterilizar en autoclave

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle WG, Buddle BM. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection*. 4:471-480.
2. Flynn L.J.A., Chan J. 2001. Immunology of the tuberculosis. *Annual Reviews of Immunology*, 19:93-129.
3. Milián S.F., Sánchez M.L., Toledo P., Ramírez C., Santillán M. 2000. Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42:13-19.
4. Pathogenesis and Diagnosis of infections with *M. bovis* in Cattle. 2nd. Report of the ISG on Cattle TB. 27 de Marzo, 2000/ <http://www.maff.gov.uk>
5. Morris R.S., Pfeiffer D.U., Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology*, 40:153-177.
6. Morrison W.I., Bourne F.J., Cox D.R., Donnelly C.A., Gettinby G., Woodroffe R. 2000. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Veterinary Record*; 146:236-242.
7. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario en Tuberculosis Bovina y Brucelosis. SAGAR. Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis. (CONETB) Octubre de 1998.
8. Grange J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*. 81(1/2):71-77.
9. Otero D.F. 2000. Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium bovis* que estimulan linfocitos T de bovino. Tesis de Doctorado, C.U. UNAM.
10. Collins D.M. 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81(1/2); 97-102.
11. González O.R, Gutiérrez C.B. 1999. Field evaluation of the single intraderma cervical tuberculin test and the interferon gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. 70:55-66.
12. Monaghan, Doherty, M.L. Collins et al. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiology*. 40:111-124.
13. Pollock J.M., Girvin R.M., Buddle B.M. 2000. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *The Veterinary Record*, 146: 659-665.
14. Rhodes SG, Buddle BM. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. 2000. *Immunology- Vol 99*:195-202.
15. Bryce M. Buddle, Pollock M.J. 2001. Use of ESAT-6 in interferon gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiology*. 80:37-40.
16. Costello E., O'Rielly P.F., Yearsley D.K., Collins J.D., Monaghan M.L., Basset H.F. 1997. A study of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of tuberculosis in cattle. *Irish Veterinary Journal*. 50:35-8.

17. Pollock J.M., McNair J., Welsh M.D., Girvin R.M., Kennedy H.E., Mackie D.P., Neill S.D. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*; 81(1/2): 103-107.
18. Pollock JM, Bowman JM. A retrospective study of red cell maternal antibodies by chemiluminescence. *Vox Sang.* 1997; 73(1):58.
19. Ryan T.J., Buddle B.M., Lisle G.W. 2000. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in Veterinary Science*; 69:57-61.
20. Walraves K., Marché S., Rosseels V., Huygen K., Godfroid J. 2002. IFN- γ diagnostic test in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 87:401-6.
21. Wood P.R., Jones S.L. 2001. BOVIGAM™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 81(1/2); 147-55.
22. Pollock JM, Douglas AJ, Mackie DP, Neill SD. 1994. Identification of bovine T-cell epitopes for three *Mycobacterium bovis* antigens: MPB70, 19,000 MW and MPB57. *Immunology*, 82:9-15.
23. Jiménez M.C., Saldaña R.B., Cañas L.M., Sánchez C.R., Galindo E.Z. 2001. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. México*. Vol 14, No. 1:39-48.
24. Ritacco V., de Kantor L., Barrera L., Errico F. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in veterinary Science*, 50:365-67.
25. Orme M. I., Cooper M.A. 2000. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunology today*
26. Flynn L.J.A. 2000. Immune responses in tuberculosis. *Current opinion in immunology*. 12:432-436.
27. García-Sancho F.C.E. 2001. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* Vol.14, No.2:114-128.
28. Buddle B.M. Aldwell F.E. 1995. Experimental *M.bovis* infection in cattle: effect of the dose of *M.bovis*, pregnancy and immune response and distribution of lesions. *N. Zeland's Vet. Journal*. 42:167-172.
29. Neill, S.D, Cassidy J, Hanna J, Pollock J.M. 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* in skin test negative cattle with an assay from bovine interferon gamma. *Veterinary Record*, 135:134-135.
30. Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B., Hanna J. 1994a. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40:41-52.
31. Neill S.D., Bryson D.G., Pollock J.M. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*. 81(1/2): 79-86.
32. Lightbody K.A. Skuce R.A., Neill S.D., Pollock J.M. 1998. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *The Veterinary Record*. 142: 295-300.

33. Estrada-Chávez C., Mancilla R., Arriaga D.C., Otero D.F. 2001. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Veterinaria México*, 32(3): 207-211.
34. Francis J. 1958. *Tuberculosis in animals and man: A study in comparative pathology*. Ed. Cassell and Company Limited London. First published, Chapter II.
35. Goodchild A.V., Clifton-Hadley R.S. 2001. Cattle-to-Cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81(1/2):23-41.
36. Silva E. 2001. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. 78:111-117
37. Miyazaki Y., Koga H., Kaku M. 1993. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 31, No.8, 2228-32.
38. Mangiapan G., Vokurka M., Hance J.A, 1996. Sequence capture-PCR improves detection of *Mycobacterial* DNA in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 34, No. 5, 1209-15.
39. Bennedsen Jorgen, Fahr A. 1996. Utility of PCR in diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Journal of clinical microbiology*. 34(6); 1407-1411.
40. Rodriguez JG, Mejía GA, Del Portillo P. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. 1995. *Microbiology*, 141:2131-2138.
41. Arriaga DC, Banda RV, Velázquez BG, Ramírez CC, Díaz OF, Valencia ZM, Estrada CC. Avances en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Reunión anual de la Investigación Pecuaria de México, 1999.
42. Pérez A., Reniero A., Frotéis A., Ritacco V. 2002. Estudio de *Mycobacterium bovis* en leche mediante métodos bacteriológicos y reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Argentina de Microbiología*. 34:45-51.
43. Vitale F, Capra G. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. 1998. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 36:1050-1055
44. De Kantor N.I., Bioch D., Roswurm J.D. 1978. *Mycobacteria* isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 39, No.7: 1233-34.
45. Dannenberg A.M. Arthur. 1993. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hospital practice*. January 15:51-58.
46. Neill S.D., Hanna J., Mackie D.P., Bryson D.G. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *The Veterinary record*, 131:45-47
47. Menzies F.D., Neill S.D. 2000. Cattle-to-Cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160:92-106.
48. Riley LW. Determinants of cell entry and intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. 1995. *Trends in Microbiology*, Vol 3, No. 1

49. Ernst JD. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 66(4):1277-1281
50. Deretic V, Fratti RA. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Molecular Microbiology*. 31(6):1603-1609.
51. Balcewics-Sablinska K.M., Keane J., Remold H.G. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *The Journal of Immunology*; 161:2636-41.
52. Keane J., Remold H.G., Kornfeld H. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, 164:2016-20
53. Dürrbaum-Landmann I., Gercken J., Ernst M. 1996. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infection and immunity*. Vol. 64, No. 12; 5384-89.
54. Rojas M., Olivier M., Gros P., Barrera L.F., García L.F. 1999. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *The Journal of Immunology*; 162: 6122-31.
55. Rojas M., Barrera L.F., Puzo G., García L.F. 1997. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages. *The Journal of Immunology*; 159:1352-61.
56. Silva C.L., Vania D.L., Lima K.M., Sartori A. 2001. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 197; 11-18.
57. Gao L.Y., Kwaik Y.A. 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*. Vol. 8, No. 7; 306-13.
58. Zychlinsky A. y Sansonetti P. 1997. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 100, No.3; 493-95.
59. Behnia M., Robertson K.A., Martin J.W. 2000. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest*. 117;1771 -77.
60. Oddo M., Renno T., Attinger A., Bakker T., MacDonald H.R. 1998. Fas Ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*. 160:5448-54.
61. Li-Min Ting, Kim A.C., Cattamanchi A., Ernst J.D. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN- γ transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *The Journal of Immunology*, 163:3898-3906.
62. Dannenberg A.M. 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology today*. Vol.12, No.7: 228-33,
63. Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F., Neill S.D. 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 119:27-44.
64. Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F, Neill S.D. 1999. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*- inoculated calves. *Journal of Comparative Pathology*. Vol.121; 321-37.

65. Neill S.D., O'Brien J.J., McCracken R.M. 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. The Veterinary Record, 122:484-86.
66. Neill S.D, McCacken R.M. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. Veterinary Record, 123:340-343.
67. Neill S.D., O'Brien J.J., Hanna J. 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. Veterinary Microbiology, 28:103-9.
68. Neill S.D. , Cassidy J.P., Hanna J., Mackie D.P., Pollock J.M., Clements A., Walton E., Bryson D.G. 1994b. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. The Veterinary Record, 135:134-135.
69. Neill S.D, Hanna J., O'Brien J.J., McCracken R.M. 1989. Transmission of tuberculosis for experimentally cattle to in contact calves. The Veterinary Record, 124:369-271.
70. O'reilly L.M. and Castello. 1988. Bovine tuberculosis with special reference to the epidemiological significance of pulmonary lesions: Irish Vet. News, 10:11-21.
71. Cantwell M. 1994. Brief Report: Congenital tuberculosis. New England Journal of Medicine. Vol. 330 (15), April 14.
72. D. Van Soolingen, de Hass PEW, Hermans PWM, Van Embden JDA. 1994. Isolation of genomic DNA from mycobacteria. Nacional Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Netherlands.
73. BioTechniques. Amplification of the conserved Cytocrome b Locus as a Versatile Internal Control for PCR Analysis in Animals. 1996. Biotechniques. Vol 20, No. 4, 604-605.
74. Manual de Inspección post-mortem de bovinos para la detección de tuberculosis. Toma y envío de muestras a laboratorio. CONETB.
75. Campuzano Granados Jaime. Comparación de diferentes pruebas anatomopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. 1998. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias: Patología Animal, UNAM.
76. Pollock J.M., Neill S.D. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. The Veterinary Journal, 163:115-127.
77. Monies RJ, Head JC. Bovine tuberculosis in housed calves. Vet Rec. 1999 Dec 18-25; 145(25):743.
78. Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Witte K, Melville L, Hides S, Wood PR. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. Aust Vet J. 1989 Jan; 66(1):15-9.
79. Díaz OF, Banda RV, Jaramillo ML, Arriada DC, González SD, Estrada-Chávez C. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. 2003. Vet. Méx., 34(1): 13-26.
80. Córdoba LD. 1997. Tuberculosis bovina en el estado de Morelos, prevalencia y factores asociados. Tesis de Maestría en Ciencias Sociomédicas y Epidemiología, UNAM.

81. Estrada-Chávez C, Díaz OF, Ruíz GO, Banda RVM, Arriaga DC. 1999. Prevalencia e incidencia de tuberculosis bovina en un hato de reciente introducción al trópico. XXXV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán.
82. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1995 Aug; 76 Suppl 1:1-46.
83. Silva E. 2001. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 78:111-17.
84. Kaufmann HE. 1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunology today.* Vol.16. No. 7: 338-342.
85. McIlroy S.G., Neill S.D., McCracken R.M. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *The Veterinary Record*, 118:718-21.
86. Duffield BJ, Norton JH, Hoffmann D. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in northern Queensland. *Aust Vet J.* 1989 Sep; 66(9):307-8.
87. Andersen P, Heron I. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1993 Mar; 61(3):844-51.
88. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 1995 Apr 1; 154(7):3359-72.
89. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science.* 1994 Sep 2;265(5177):1395-400
90. Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun.* 1994 Jun; 62(6):2536-44.
91. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine.* 2002 Jan 15;20(7-8):1126-33
92. Estrada-Chávez C. 1995. Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón gama y ELISA, basado en la inspección postmortem. Tesis de Licenciatura, UNAM.
93. Wilesmith JW, Williams DR. 1987. Observations on the incidence of herds with non-visible lesioned tuberculin test reactors in southwest England. *Epidem. Infect.* 99:173-178.
94. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest.* 1996 Jul; 8(3):351-4.
95. Ausubel Frederick M, Brent R, Moore D, Seidman JG, Smith J, Short A. *A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology.* Published by John Wiley and Sons, Inc. Fourth Edition. USA, 1999.
96. Bascunana CR, Belak K. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct; 34(10):2351-5.

97. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 1995 Feb; 43(2-3):227-40.
98. Rempt D. 1954. Veterinary work in the Netherlands: Report by the Netherlands Veterinary Service, p.80.
99. Krishnaswami S, Nagaraja KV, Keshavamurthy BS, Adinarayanaiah CL, Nanjiah RD, Mysore. *J. Agric. Sci.* 1974; 8: 423.
100. Amadori M., Tameni S., Cvirani S., Giandomenico Q. 1998. Antibody test for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:566-568.
101. O'Reilly LM and Costello E. 1988. Bovine tuberculosis with special reference to the epidemiological significance of pulmonary lesions. *Irish Veterinary News.* Sept, 10:11-21.
102. Costello E., Doherty M.L., Monaghan M.L., Quigley F.C., O'Reilly P.F. 1998. A study of Cattle-to-Cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *The Veterinary Journal*, 155:245-250.
103. Stamp JT.1948. Bovine pulmonary tuberculosis. *Jpurnal of Comparative Pathology and Therapeutics.* 58, 9-23.
104. Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD. 1999b. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.*Feb 6 (144):139-142
105. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* 1996 Mar; 64(3):683-90. Review.
106. Griffin JM, Haheesy T, Lynch K, Salman MD, McCarthy J, Hurley T. 1993. The association of cattle husbandry practices, environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Prev. Vet. Med.* 17: 145-160.
107. Doherty LM, Bassett FH, Quinn PJ, Davis CW, Monaghan LM. 1995. Effect of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.*, Vol 56 (10):1300-1306.
108. Buddle BM, Aldwell FE, Pfeffer A, Lisle GW, Corner LA. 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle: Effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *New Zeland Vet. Journal.* 42:167-172.
109. Doherty LM, Monaghan ML, Bassett FH, Qinn JP, Davis CW. 1996. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immun. Pathol.* 49:307-320.
110. Barlow ND, Kean JM, Caldwell NP, Ryan TJ. Modelling the regional dynamics and management of bovine tuberculosis in New Zealand cattle herds. *Prev Vet Med.* 1998 Jul 17; 36(1):25-38.
111. Howard AD, Zwilling BS. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clin Exp Immunol.* 1999 Mar; 115(3):428-34.