

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ENTRE LAS PRUEBAS DE BACTERIOLOGIA Y FLUJO LATERAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN BOVINOS.

TESIS:

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA:

MVZ. RAQUEL PÍO GARCÍA

Determinación de la sensibilidad y especificidad entre las pruebas de bacteriología y flujo lateral para el diagnóstico de tuberculosis en bovinos. Tesis presentada por Raquel Pío García como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista
Director Principal

Dr. Gilberto López Valencia
CoDirector

M.C. Rosa María Bermúdez Hurtado
Asesor

M.C. Alfonso De la Mora Valle
Asesor

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

Mexicali, Baja California a Enero del 2010.

Lugar y Fecha

AGRADECIMIENTOS

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista, Dr. Gilberto López Valencia, M. C. Rosa María Bermúdez Hurtado, M. C. Alfonso de la Mora Valle, Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto, M. C. José Carlomán Herrera Ramírez, M.C. Carolina Pujol Manríquez, gracias por apoyarme con sus conocimientos y experiencia a lo largo del tiempo que hemos compartido. Aprendí de ustedes el amor por el trabajo científico, sé que me falta mucho sin embargo disfruté con ustedes el tiempo que pasamos realizando el arduo trabajo de laboratorio, el trabajo de campo, los planes para que los resultados fueran fidedignos y confiables, por la responsabilidad que tenemos no sólo con nuestra Universidad sino también con los que nos apoyaron económicamente para la realización de ésta investigación y aún para la sociedad ya que los resultados que obtenemos no sólo son para nosotros sino para ponerlos a disposición de quien se apoye en nuestra investigación para seguir adelante, perfeccionándola y así sentirnos orgullosos de haber hecho aunque sea una pequeña aportación para beneficio tanto de nosotros como seres humanos como para esos seres a los que consideramos inferiores pero que sin ellos no existiríamos y a los que tenemos la responsabilidad de cuidar porque todos somos útiles no importando la especie a la que pertenezcamos.

DEDICATORIA

A Dios.

Gracias por haberme permitido llegar a este momento si no me hubieras dado la vida no podría haber disfrutado aunque sea un pequeño vislumbre de lo que es la ciencia.

A mi familia.

Ricardo García M., R. D. Eliud García Pío. Gracias por haberme apoyado a lo largo de estos años de trabajo y estudio no tengo con que pagarles todo su amor y su apoyo.

A mis padres.

Manuel Pío P., Silvia García L. Gracias por todo su amor y porque sé que siempre estoy y estaré en sus oraciones.

A mis hermanos.

Saraí, Silvia, María y Samuel Pío García. Gracias por todo su amor y su apoyo incondicional sobre todo en los momentos difíciles siempre cuento con ustedes.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	i
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Etiología	4
Patogenia	5
Factores de Virulencia	8
Inmunología	10
Epidemiología	16
Pruebas diagnósticas para la detección de tuberculosis bovina	21
Examen postmortem e histopatología	21
Cultivo microbiológico	22
Prueba de la tuberculina	23
Pruebas de laboratorio basadas en sangre	26
Prueba de gamma interferón	26
Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	27
Métodos de reconocimiento del ácido nucleico	28
Prueba de flujo lateral	29
MATERIALES y MÉTODOS	31
Lugar de Estudio	31
Inspección post-mortem	31
Toma de muestras	31
Estudios bacteriológicos	31
Prueba de Flujo Lateral	32
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	33
LITERATURA CITADA	35

LISTA DE CUADROS

Resultados

	Pág.
Cuadro 1. Determinación de la sensibilidad y especificidad entre las pruebas de diagnóstico Bacteriológico y Flujo Lateral	33

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad que causa un gran impacto tanto en salud pública como en el comercio de productos y subproductos. Además, afecta una gran variedad de especies incluyendo a los humanos. La prueba intradérmica ha sido utilizada desde hace aproximadamente un siglo. A pesar de los avances científicos y tecnológicos, sigue utilizándose como única prueba para la detección en el ganado bovino. Actualmente siguen realizándose una gran cantidad de investigaciones en la búsqueda de una prueba fácil de aplicar, económica y con una alta sensibilidad y especificidad. En el presente trabajo se evaluó la prueba inmunocromatográfica de flujo lateral basada en la detección de anticuerpos de *Mycobacterium bovis* en animales enfermos de tuberculosis. Se analizaron 556 sueros de bovinos con lesiones granulomatosas sugestivas que fueron sacrificados en el rastro de la ciudad de Tijuana, Baja California. Las lesiones fueron analizadas utilizando la tinción de Hematoxilina-eosina confirmándose con la tinción Ziehl Nielsen. Los tejidos fueron procesados para cultivo bacteriológico como prueba de oro. Los resultados que se obtuvieron con la prueba de Flujo Lateral fue una sensibilidad de 43% y una especificidad de 53.8%. Los resultados para esta prueba son aún insuficientes cuando se aplica en animales infectados de manera natural. Sin embargo por sus características (económica, rápida, fácil de manejar e interpretar) deberá de ser evaluada bajo diferentes escenarios de prevalencia para descubrir en qué momento es más eficiente.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), bacteria que afecta principalmente el aparato respiratorio y que se manifiesta en forma crónica. La TB se caracteriza por el desarrollo de granulomas o tubérculos en los pulmones, linfonódulos y algunos otros órganos. La principal forma de diseminación entre hatos es por la introducción de animales enfermos. Los factores más importantes en la transmisión son el tamaño del hato, la edad y la falta de medidas de prevención

y control en las explotaciones. Por otra parte *M. bovis* tiene un espectro de hospederos muy amplio, que incluye bovinos, perros, gatos, cerdos, elefantes, camellos, llamas, jirafas, conejos y seres humanos (Thoen et al., 2006).

Esta enfermedad es causante de cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería nacional, además del impacto a la salud pública. En México, la tuberculosis limita la movilización, comercialización y/o exportación del ganado, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores. Es importante notar que perder la condición para exportar ganado pone en riesgo los ingresos que son de aproximadamente 8 900 millones de pesos, mas la pérdida de tiempo y recursos empleados (NOM-EM-017-ZOO-2005, NOM-031-ZOO-1996, Thoen et al., 2006).

Hasta ahora el control de la tuberculosis bovina está basado en un diagnóstico oportuno y la eliminación de los animales infectados, junto con la prevención de la diseminación de la infección tanto dentro como hacia fuera de los hatos (NOM-031-ZOO-1995).

La prueba de tuberculina es el método estándar para la detección de la tuberculosis bovina. Esta técnica implica la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis* y la subsiguiente detección de inflamación en el sitio de inyección, 72 hrs. más tarde. Sin embargo, se debe considerar la probable existencia de micobacterias no tuberculosas (atípicas) en el ambiente, lo cual puede modificar y disminuir en forma importante la especificidad. En otros países se ha incorporado la prueba de Gamma Interferón cuya sensibilidad y especificidad son 94% y 98% respectivamente (González et al, 1999, Lilenbaum et al., 1999, Ryan et al., 2000). Existen además otras técnicas diagnósticas para la detección de tuberculosis bovina, como el cultivo microbiológico, histopatología, y técnicas moleculares (tales como: PCR, *spoligotyping*, *VNTR's*) (Liébana et al., 1995). Lamentablemente estas pruebas solo se pueden realizar con personal capacitado y en laboratorios que cuenten con el equipo adecuado para su realización. Actualmente la búsqueda de pruebas complementarias o alternativas a la tuberculina se han enfocado al desarrollo de pruebas serológicas que sean

más sensibles, específicas y de fácil manejo, e interpretación. Una de estas pruebas es la denominada prueba de flujo lateral, la cual ha mostrado una sensibilidad y especificidad variable dependiendo si se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis en campo o a nivel experimental. Greenwald et al., 2003 aplicaron esta prueba a 178 tejones de los cuales 78 fueron positivos a tuberculosis y 100 negativos, donde se obtuvo una sensibilidad de 52.6% y una especificidad de 95%. Sin embargo cuando, se utilizó esta prueba en ganado bovino infectado de manera experimental, el comportamiento de la sensibilidad se incrementó a un 96% (Waters et al., 2006). Estos hallazgos sobre todo cuando se evalúa a nivel experimental han demostrado el potencial de esta prueba como una herramienta útil para la detección temprana de ganado infectado con *M. bovis* (Waters et al., 2006). Debido a que solo existe un trabajo publicado sobre la utilización de esta prueba bajo condiciones de infección natural, el objetivo de este trabajo es determinar la sensibilidad y especificidad entre las pruebas de bacteriología (prueba de oro) y flujo lateral para el diagnóstico de tuberculosis en bovinos bajo condiciones naturales.

REVISIÓN DE LITERATURA

Etiología

El complejo *Mycobacterium Tuberculosis* (*M. tuberculosis*) comprende a las especies *M. tuberculosis* (bacilo tuberculoso humano), *M. bovis* (bacilo tuberculoso bovino), *M. africanum* (grupo heterogéneo de cepas encontradas principalmente en África ecuatorial y con propiedades intermedias entre ambos tipos), *M. bovis* BCG (cepa vacunal derivada de *M. bovis*) y *M. microti* (bacilo tuberculoso de roedores y pequeños mamíferos) (Cousins et al., 1990).

Mycobacterium bovis fue descrito por primera vez por Smith en 1896, quien lo designó como el bacilo de la tuberculosis bovina (Alfredsen y Saxegaard, 1992). La especie bovina está considerada como su principal huésped (Cousins et al., 1993).

Las micobacterias son microorganismos de crecimiento lento, con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C aproximadamente, no pigmentados y aeróbicos o microaerofílicos (según la especie). Como el resto de las micobacterias, son microorganismos ácido-alcohol resistentes, lo cual es aprovechado para la descontaminación de las muestras antes de la siembra. Debido a su lenta velocidad de crecimiento (3-5 semanas), las micobacterias serían “ahogadas” por el crecimiento de otros microorganismos si las muestras no fueran tratadas para destruir a las bacterias y hongos acompañantes que pueden estar en las muestras que se reciben para cultivo (Corner et al., 1995).

La pared celular define las características de esta bacteria ya que contiene el 60% de los lípidos de su peso seco, haciéndola hidrófoba y resistente a agentes microbicidas, fármacos y a la destrucción por calor. Los componentes de la pared celular contribuyen a la virulencia, persistencia dentro de los macrófagos y a la regulación de la respuesta inmune del huésped (Chen et al., 2006).

La envoltura de la bacteria consta de tres componentes principales: una membrana plasmática unida mediante enlace covalente al ácido micótico, un complejo de peptidoglicanos una proteína cinasa activada por mitógenos (MAPc) que son moléculas unidas a arabinolactano (AG) y una cápsula rica en polisacáridos (Mokrousov et al., 2002).

Un lípido característico conocido como “cord factor” o factor cordón está formado por varias moléculas que se encuentran en la capa periférica de la pared celular y recibe este nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones. El factor cuerda está formado por un complejo de tres macromoléculas: peptidoglicano, arabinolactano y micolatos (Rhoades et al., 2003).

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el antígeno lipoarabinomanam que tiene un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis. También están presentes los sulfolípidos de trehalosa que son los responsables de la tinción ácido-resistente de las bacterias con el colorante rojo fascina, por lo que se les llama bacilos acidorresistentes (Tan y Parker., 2003).

Patogenia

Factores tales como manejo, edad y nutrición son determinantes en la vía de infección, así como el período de incubación, proceso de enfermedad y diseminación. La principal vía de ingreso de *M. bovis* es por aerosoles, al toser o aspirar el animal infectado las microgotas estas son inhaladas por otro bovino y llegan a su sistema respiratorio dando comienzo una nueva infección. Esto se ve favorecido por contacto directo diariamente de los bovinos en pastizales, comedores, corrales y sala de ordeño. Otra vía de ingreso es la digestiva por el consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal y orina. La vía digestiva es muy importante en terneros que se alimentan de leche cruda proveniente de vacas infectadas con tuberculosis

debido a que las vacas infectadas eliminan el microorganismo en la leche. Otras vías no usuales son la vía cutánea, congénita y genital. El ganado expuesto vía ingestión o agua contaminada con *M. bovis* casi siempre desarrolla focos primarios en tejidos linfáticos asociados con el tracto gastrointestinal. Otras micobacterias incluidas *Micobacterium avium* subsp. *Avium*, *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansassii*, *M. fortuitum* y *M. tuberculosis* pueden inducir sensibilidad a la prueba dérmica de tuberculina, pero no producen una enfermedad progresiva pulmonar en el ganado. La limpieza mucociliar y epitelio ciliar en los pasajes respiratorios superiores proveen una defensa contra la infección por la inhalación de micobacterias. Sin embargo, los microorganismos transportados en partículas de polvo o gotas de agua que no afecten a la capa mucociliar pueden pasar a través de los bronquiolos terminales y acceder a los espacios alveolares. El tamaño aproximado de los bronquiolos terminales es aproximadamente de 20µm comparado con 1-4 µm de un bacilo ácido resistente. Seguido a la exposición por aerosoles, *M. bovis* es transportado a los pasajes pequeños de aire, donde es ingerido por los fagocitos. Los fagocitos pasan a través del revestimiento de los bronquiolos. Entran a la circulación y son transportados a los nódulos linfáticos, parénquima de los pulmones, y otros sitios. Después de la ingestión de los bacilos, los macrófagos mononucleares intentan matar al microorganismo, sin embargo, el bacilo tuberculoso virulento posee la habilidad de escapar de la destrucción. La ingestión de los bacilos por los fagocitos en los fagosomas o vacuolas intracitoplasmáticas protege a los organismos de los componentes bactericidas en el suero. Después de la ingestión por los fagocitos la micobacteria evita la fusión del fagolisosoma y la acidificación (Sturgill-Koszycki et al., 1994).

La respuesta celular intenta controlar la enfermedad resultando en la acumulación de un gran número de fagocitos, y finalmente la formación de lesiones macroscópicas, denominados tubérculos. Después de 10-14 días, en modelos murinos, las respuestas desarrolladas por la inmunidad mediada por células (IMC) y los macrófagos del huésped tienen un decremento en la capacidad de destruir al bacilo intracelular. Las respuestas IMC son mediadas por los Linfocitos T, los cuales liberan linfocinas que atraen, inmovilizan y

activan adicionalmente las células mononucleares de la sangre y médula ósea a los sitios donde la micobacteria virulenta o sus productos están. La hipersensibilidad celular contribuye al desarrollo de muerte celular y destrucción tisular (necrosis caseosa). En algunos casos licuefacción y formación de cavidades ocurren como resultado de acción enzimática en proteínas y lípidos. La ruptura de estas cavidades dentro de los bronquios permite la diseminación del bacilo por aerosoles. Los macrófagos activados migran a las terminaciones de los nódulos linfáticos, tanto bronquial como mediastínico. Los nódulos linfáticos son más comúnmente infectados que otros tejidos debido a que los fluidos del animal eventualmente pasan a través de los nódulos en donde la red de trabéculas atrapa al microorganismo. Las lesiones primarias casi siempre están localizadas en un nódulo o nódulos y pueden ser extensas y firmes. La fibrosis del tejido conectivo se desarrolla por la formación dinámica de un granuloma. La formación del granuloma es un intento del huésped de localizar el proceso de la enfermedad y permite que los mecanismos inflamatorios e inmunes destruyan al bacilo. Pocas lesiones pueden aparecer como en estado de regresión mientras comienzan a encapsularse por un bien organizado tejido conectivo, mientras que, algunas lesiones pueden contener al bacilo viable. Típicamente, la apariencia microscópica de un granuloma es focal y tiene algunas áreas de necrosis caseosa en la región central encerrada por una zona de células epiteloideas, linfocitos y algunos granulocitos. La mineralización puede estar presente en los centros necróticos; en lesiones avanzadas, algunos focos de mineralización pueden estar unidos. Células multinucleares gigantes con núcleos en forma de herradura o anillo cerca del borde citoplásmico, son casi siempre vistas en la zona cercana del área necrótica. Un límite externo de tejido conectivo fibroso está frecuentemente presente entre las lesiones y el tejido normal (Thoen et al., 2006).

Los mecanismos de respuesta inmune natural y adquirida de los bovinos son casi siempre efectivos en limitar la proliferación del bacilo tuberculoso y el desarrollo de la enfermedad progresiva. La eliminación de *M. bovis* del tejido del huésped depende, en parte, de la destrucción del bacilo en los macrófagos mononucleares que han sido activados por linfocinas. La evidencia que apoya

este concepto está principalmente basada en información obtenida de estudios realizados en animales de laboratorio utilizando cepas de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* (Chan et al., 1992).

Factores de virulencia

El desarrollo de la enfermedad en un animal depende de la habilidad de *M. bovis* de multiplicarse dentro de las células fagocíticas y de la inducción de la respuesta del huésped como la acción bactericida asociada con esta respuesta. La patogenicidad de la micobacteria es un fenómeno multifactorial que requiere de la participación y efectos acumulativos de varios componentes incluidos lípidos complejos y proteínas de la pared celular y del citoplasma del bacilo (McNeill and Brennan., 1991). La mayoría de los estudios sobre los determinantes de virulencia han sido llevados a cabo más con *M. tuberculosis* que con *M. bovis*. Sin embargo la presencia de genes homólogos en *M. bovis* y la relación cercana entre estos microorganismos indican el uso de determinantes virulentos y mecanismos de patogenicidad.

Lípidos complejos, extraídos tanto de variedades virulentas como atenuadas han sido ampliamente evaluadas para obtener información o significancia en la enfermedad (Chan et al., 1991.Schluguer and Rom., 1998). La pared celular está compuesta por tres moléculas unidas por enlaces covalentes: peptidoglicano, arabinolactano y ácido micólico. El complejo glicolípido presente en la pared celular de las variedades virulentas y atenuadas se ha estudiado para conocer su papel en la formación del granuloma. Un lípido característico en estas bacterias les provee habilidad para formar cordones (cord factor) este factor cuerda es un micósido identificado como *trehalosa 6,6-dimicolato*, esta es una molécula mixta que se encuentra en la capa periférica de la envoltura y es el mayor componente de la pared celular característico del bacilo además este factor cuerda no induce la sensibilidad a la tuberculina, pero inhibe la migración de los leucocitos y es leucotóxica, recibe este nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones. El factor cordón puede ser extraído de las cepas virulentas con éter de petróleo, también se ha asociado a la

inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los macrófagos, fenómeno que se considera clave para la sobrevivencia de *Mycobacterium* en los macrófagos (Rohades et al., 2003). Tienen también estas bacterias capacidad para producir cantidades significativas de amoníaco, evadir el ambiente tóxico de la vacuola lisosomal, inhibiendo la formación del fagolisosoma y disminuyendo la potencia de las enzimas intralisosomales vía la alcalinización. Dos enzimas que pertenecen al metabolismo del amoníaco, la ureasa micobacteriana y la glutamino sintetasa, han sido asociadas a la interrupción fagolisosomal y a la sobrevivencia micobacteriana (Harth et al., 1994).

Los lípidos de la membrana externa son los componentes micobacterianos que interactúan con el hospedero, y afectan los enlaces hacia los receptores de los macrófagos, éstos lípidos también propician la respuesta inflamatoria, los manósidos fosfatidilinositol y lipoarabinomano (LAM) son detonantes de la producción de citocinas y quimiocinas (CK) de las células mononucleares (Rhoades, 2003). La LAM es un lipoglicano compuesto de tres dominios, un núcleo polisacárido formado por unidades de D-manana, D-arabinomano, un dominio formado por fosfatidilinositol anclado a la membrana y un polisacárido; LAM inhibe la proliferación de células T, desecha los radicales libres de oxígeno, bloquea la activación transcripcional de genes que inducen el IFN- γ , inhibe la actividad de la proteína cinasa, y altera la expresión de las citocinas por macrófagos, LAM también está implicada en la inducción de fiebre, en la necrosis del tejido y en la formación de cavidad pulmonar (Chan et al., 1991).

Los sulfolípidos de trehalosa son los responsables de la tinción ácidorresistente de las bacterias con el colorante rojo carbolfusina, por lo que a estos microorganismos también se les llama bacilos ácidorresistentes. Estos sulfolípidos se unen a los receptores “basurero” de clase A (ScR) o receptores “scavenger” en macrófagos, lo que favorece la entrada de la bacteria a la célula hospedera; además evita la maduración del fagosoma del macrófago cuando esta infectado porque inhiben a la proteína C cinasa y como consecuencia de

esto, también se ve inhibida la producción de óxido nítrico (NO) y de citocinas proinflamatorias (Tan and Parker 2003).

Las características de la envoltura le proporcionan resistencia a agentes microbicidas, fármacos y a la destrucción por calor. Los componentes de la pared celular contribuyen a la virulencia, persistencia dentro de los macrófagos y a la regulación de la respuesta inmune del hospedero. El establecimiento de la infección también depende de la interacción inicial entre los componentes de superficie de las micobacterias con los componentes de la célula hospedera (Chen et al., 2006).

Inmunología

Cuando *M. bovis* penetra en el organismo (ya sea por vía aerógena o por cualquier otra) es ingerido por células fagocitarias. En los bovinos las principales células fagocitarias son los fagocitos polimorfonucleares y los fagocitos mononucleares; los primeros predominan en la sangre periférica, y dentro de los segundos están los monocitos circulantes y los fagocitos tisulares (presentes en un elevado número en tejidos como hígado, bazo, ganglios linfáticos y pulmones). Cuando *M. bovis* se establece en un tejido, actúa como un potente factor quimiotáctico que atrae a los polimorfonucleares y a los macrófagos hacia el foco de infección. La ingestión de los bacilos se acelera con la presencia de opsoninas (Ac que “tapizan” a los bacilos).

La interacción entre las micobacterias el hospedador y el sistema inmune es un proceso complejo. A partir de una infección se instauran dos tipos de inmunidad, la de base humoral y la de base celular. La principal defensa del huésped frente a las micobacterias es la inmunidad celular. La respuesta inmune celular natural y adquirida logra con frecuencia limitar la proliferación de los bacilos y el desarrollo progresivo de la enfermedad. La activación de los macrófagos que destruyen a la micobacteria, ocurre a través de la respuesta inmune celular que han sido activados por linfocinas. La principal función de los neutrófilos y los macrófagos es destruir los

microorganismos fagocitados mediante la función de los lisosomas con los fagosomas y la producción de moléculas microbicidas (Chan et al., 1992).

La activación de los macrófagos que destruyen a la micobacteria, ocurre a través de la respuesta inmune celular. Las enzimas lisosomales y los ROI (intermediarios reactivos de nitrógeno), se producen en el interior de los fagolisosomas, donde se activa por el pH ácido (4.5-5.0). El NO (óxido nítrico) se produce en el citosol y se difunde en el interior de los fagolisosomas, donde se activa por el pH ácido. El NO es un factor inmune que detiene la replicación micobacteriana (Nathan and Shila., 2000).

Existen dos tipos de respuesta inmune, la Th1 y la Th2. la respuesta Th1 lleva al control de infecciones de microorganismos intracelulares (Lagranderie et al., 2003), la inmunidad mediada por Th1, controla la síntesis de citocinas proinflamatorias y el daño del tejido, esta respuesta se traduce en la activación de los macrófagos por una activación adecuada de linfocitos, en particular de células colaboradoras con marcador CD4, productoras de IFN- γ , el mediador más importante en la defensa contra las micobacterias. Los macrófagos y las células T CD4⁺ son dos tipos de células importantes durante la respuesta antitubercular. El IFN- γ producido por el antígeno específico y los macrófagos que activan a las células que activan los linfocitos T CD4⁺ conducen a la producción de óxido nítrico, esencial para la provocar la muerte del bacilo (Waters et al., 2003). Los cambios de transcripción bacteriana medida al inicio de la respuesta inmune mediada por Th1, son inducidas directa o indirectamente, por la generación de NO por macrófagos infectados debido a la disminución de oxígeno que provocan (Shi et al., 2003).

El IFN- γ se relaciona con la IL-2 y con el TNF- α , así como también la IL-12, esta citosina induce la respuesta del huésped hacia las micobacterias y otros patógenos intracelulares, IFN- γ activa al macrófago para que produzca radicales libres de oxígeno y nitritos (NO₂⁻) con actividad antimicrobiana. Por otra parte, la respuesta inmune Th2 se caracteriza por la producción de diferentes citocinas como IL-4 e IL-10 que activan linfocitos B para producir anticuerpos, activan eosinófilos y bloquean la actividad bactericida de los

macrófagos. El IFN- γ , GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago) y el TNF- α activan a los macrófagos para resistir el crecimiento de patógenos intracelulares e incrementar la producción de diversas sustancias antimicrobianas, como ROI, NO y enzimas lisosomales (Weatherby et al., 2003).

Una función esencial del IFN- γ es activar a los macrófagos, dando como resultado el incremento de la fagocitosis, la expresión del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase I y II, la inducción de IL-12, NO y la producción de superóxido, los cuales son importantes en la eliminación de patógenos intracelulares (Feng et al., 1999).

Además del sistema oxidasa fagocítica, los macrófagos cuentan con un sistema de generación de radicales libres, la iNOS (sintetasa de óxido nítrico inducible), esta es una enzima citosólica que no existe en los macrófagos en reposo, pero puede inducirse en respuesta al LPS (lipopolisacárido) en combinación con IFN- γ . Otro mecanismo antimicrobiano importante en los macrófagos es la producción de RNI (intermediarios reactivos de nitrógeno) a través de la vía dependiente de L-arginina. En experimentos realizados en ratones se ha podido correlacionar la producción de los macrófagos de RNI con la capacidad para eliminar micobacterias (Adler et al., 1995). Las micobacterias persisten en los macrófagos dentro de los granulomas, en distintas lesiones representadas por un área central necrótica por células inflamatorias que consiste en macrófagos epiteliales, células multinucleadas, células T, B y ciertas zonas de fibroblastos, la formación del granuloma es importante en la defensa del huésped contra bacterias intracelulares y otro tipo de antígenos. La formación del granuloma es compleja, depende de la migración y activación de las células inmunes, esta se inicia con la expresión de citocinas y Ck (células asesinas) en respuesta a antígenos micobacteriales. (Choi et al., 2002). Las células T son las primeras en influenciar el curso de la enfermedad o en detener la infección, la continua activación de estas células conduce a la formación de granulomas con necrosis central, denominada necrosis caseosa, causada por los productos de los macrófagos y tales como enzimas lisosómicas que producen intermediarios reactivos de oxígeno (ROI). Un

mecanismo que utilizan los macrófagos y neutrófilos activados es la conversión catalítica de oxígeno molecular en radicales libres oxihalogenúricos, que son agentes oxidantes muy reactivos que destruyen los microorganismos. El principal sistema generador de radicales libres es el sistema de la oxidasa fagocítica, ésta es una enzima que se ensambla en los macrófagos activados en la membrana plasmática y en la membrana fagolisosómica. La función de esta membrana es reducir el oxígeno molecular a productos ROI, como los radicales superóxido, utilizando la forma reducida de fosfato dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH). El superóxido experimenta una dismutación enzimática hacia peróxido de hidrógeno, que es usado por la enzima mieloperoxidasa para convertir los iones halogenuro (normalmente no reactivos) en ácidos hipohalogenosos que son tóxicos para las bacterias. El proceso por el cual los ROI se producen se llama estallido respiratorio. El TNF y el LPS pueden sensibilizar a los neutrófilos para producir grandes cantidades de ROI en respuesta a otros activadores, como los péptidos de N-formilmetionil bacterianos y las Ck (Lazarevic et al., 2003).

Las APC (células presentadoras de antígenos) son células que exponen en su superficie fragmentos peptídicos de antígenos proteicos, asociados a moléculas del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) y activa las células T específicas de los antígenos. Además de presentar complejos péptido-molécula del MHC, las APC también deben expresar moléculas coestimuladoras para activar a los linfocitos T. las DCs (células dendríticas son APC con capacidad para inducir la respuesta inmune primaria derivadas de la médula ósea presentes en los tejidos epiteliales y linfoides que se caracterizan desde el punto de vista morfológico por finas proyecciones membranales y actúan como APC para los linfocitos T no estimulados; además, son importantes para el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos proteicos (Banchereau and Steinman., 1998).

La hipersensibilidad retardada es el reclutamiento de las células T en los tejidos para ser activadas por las células presentadoras de antígenos con el fin de producir citocinas. La no respuesta a los antígenos se conoce como anergia (negativo a las pruebas de inmunidad celular), y refleja una deficiencia

de los mecanismos de defensa del huésped. El ganado anérgico enfermo con *M. bovis* tiene normalmente lesiones múltiples y con tendencia a la progresión, también presentan una alta tasa de anticuerpos los animales severamente afectados por la enfermedad en relación con los menos afectados (Lepper and Corner., 1983).

Los receptores de tipo Toll, se encuentran en la superficie celular de los monocitos, macrófagos, células epiteliales, células dendríticas y otras células. Señalan la activación de los macrófagos en las respuestas de inmunidad innata, regulan las señales de la expresión genética de diversos patógenos y es acompañada por una fuerte descarga de actividades asociadas tales como la fagocitosis, opsonización, degradación y proceso de fragmentos moleculares durante la presentación y expresión de péptidos antimicrobianos (McDonough et al., 1993).

El C' (complemento). Está constituido por dos vías, la clásica y la alterna, se activan mediante complejos antígeno-anticuerpo o por la superficie de los microorganismos, respectivamente y consisten en una cascada de enzimas proteolíticas que generan mediadores de la inflamación y opsoninas. Ambas vías conducen a la formación de un complejo lítico celular final común que se inserta en la membrana de las células. La capacidad adaptativa de las micobacterias permite que la propia bacteria pueda activar la vía alterna del C' para favorecer la producción de C3b y C3bi y puede inducir la formación de C3 convertasa reclutando fragmentos de C2a para generar C3b sin la activación temprana de los componentes de la vía clásica y alterna del C'. Algunas moléculas del sistema complemento tienen una función dual en la fagocitosis de las micobacterias, la fracción C3b se une inespecíficamente a los carbohidratos de la superficie del patógeno y es reconocida a través de CRs: CR1, CR3 y CR4 de los macrófagos durante la fagocitosis. Las micobacterias pueden ser opsonizadas con moléculas de la fracción de C', C3b, inmunoglobulinas G (IgG), proteína de unión a manosas (MBP), así como por el factor surfactante SP-A; esto ayuda a la bacteria a ingresar al macrófago de manera eficiente. Las micobacterias opsonizadas con IgG se unen a receptores para el Fc de las inmunoglobulinas y esta vía de entrada desencadena una

respuesta más agresiva en contra de ellas. El hábitat intracelular confiere ventajas importantes a las micobacterias porque quedan protegidas de mecanismos efectores de la respuesta inmune del hospedero, como lisis por C' (Kaufmann., 2003).

Las opsoninas son macromoléculas que se unen a la superficie de un microorganismo que puede ser reconocida por los receptores de superficie de los neutrófilos y los macrófagos aumentando la eficacia de la fagocitosis del microorganismo. Las opsoninas son los anticuerpos IgG, que son reconocidos por los receptores Fc y presentes en los fagocitos y fragmentos de las proteínas del C' y que son reconocidos por CR1 y por la integrina leucocítica Mac-1 o CR3. Las colectinas son una familia de proteínas, entre ellas la lectinas de unión a manosa (MBL), que se caracterizan por la presencia de un dominio de tipo colágeno y de un dominio de lectinas. Las colectinas participan en las funciones del sistema de inmunidad innata actuando como receptores de reconocimiento de patrón de microorganismos y pueden activar el sistema del C' uniéndose a C1q (Voorhout et al., 1992).

Las micobacterias tienen varias estrategias para evitar ser destruidas por los fagocitos; por ejemplo, puede tomar a los MR (receptor manosa) para activar diversos eventos; inhibe el Ca^{2+} que señala los receptores mediados por C', el cual puede contribuir a que fallen los mecanismos de muerte; puede inhibir la acidificación del fagosoma y modificar el trayecto intracelular de las vacuolas, así ellas se comportan como parte del compartimiento endosomal en lugar de los fagolisosomas tóxicos, esas vacuolas liberan grandes cantidades de LAM las cuales se insertan dentro del GPI que modifica la habilidad para responder a IFN y a la presentación del antígeno a las células T CD4+ (Rook et al., 2001).

Las Ig's (inmunoglobulinas), también llamadas anticuerpos son un tipo de molécula glucoproteica, producida por los linfocitos B y que se une a los antígenos, a menudo con un elevado grado de especificidad y afinidad. Las regiones variables N- terminales de las cadenas pesadas interaccionan funcionalmente con otras moléculas del sistema inmunitario. Las Ig's

secretadas realizan diversas funciones efectoras, como la neutralización de antígenos, la activación del C' y la promoción de la destrucción de microorganismos dependiente de los leucocitos. Las micobacterias pueden ser opsonizadas por Ig's, principalmente por IgG para ser ingeridas por los macrófagos, es posible que ellos utilicen este mecanismo para adherir e ingerir a las micobacterias vivas, pero no es utilizado como primera elección por estas, ya que requiere de grandes cantidades de la opsonina para conseguir una adherencia óptima, el internamiento de la micobacteria le confiere acceso a la ferritina, que es una enzima que se encuentra en abundancia en los lisosomas y le aporta nutrientes para su metabolismo (Armstrong and Hart., 1975).

Los linfocitos T son un tipo de células que median la respuesta inmune celular en el sistema de inmunidad adaptativa, maduran en el timo, circulan en la sangre, en tejidos linfoides periféricos y son reclutados a sitios periféricos de exposición al antígeno. También expresan receptores para el antígeno TCR (receptor de célula T) que reconocen fragmentos peptídicos de proteínas extrañas unidos a moléculas del MHC. Las subpoblaciones funcionales de los linfocitos T son las células T CD4⁺ colaboradoras y los linfocitos T citolíticos (CTL) CD8⁺. Las células T CD4⁺ producen antígenos proteicos asociados a moléculas de clase II del MHC, estas células T producen IFN-γ y activan a los macrófagos para destruir microorganismos residentes en el interior de los fagosomas. La infección primaria por el bacilo tuberculoso induce en el organismo la memoria inmunitaria mediada por las células T CD4⁺ (Muller et al., 1987).

Epidemiología

M. bovis posee uno de los más amplios rangos de hospedadores, entre los patógenos conocidos, la epidemiología de esta infección es muy compleja y engloba interacciones entre el hombre, los animales domésticos y los animales salvajes. Entre los hospedadores de esta especie se encuentra el hombre, los primates no humanos, cabras, cerdos, jabalí, oveja, vaca, caballo, asno, gato, perro, ciervo, bisonte, búfalo, antílope, oryx, camello, llama, alpaca, reno, tejón,

liebre, conejo, hurón, elefante, rinoceronte, tigre, león, foca,..etc. (Wilesmith et al., 1982. Stetter et al., 1995. Ragg et al., 2000. Delahay et al., 2002).

Son varias las rutas de transmisión para la infección de *M. bovis*, pero las rutas de infección primaria son los tractos respiratorio y digestivo. Estudios experimentales en animales expuestos a la infección con *M. bovis* por diferentes rutas (intratraqueal, oral, intravenosa, intraperitoneal) ha demostrado que la naturaleza y extensión de las lesiones tuberculosas varían de acuerdo a la ruta de exposición (Francis., 1971). Y la localización de las lesiones tuberculosas nos indica de qué manera *M. bovis* ingresa en el huésped infectado. Estas incluyen lesiones en el sistema respiratorio, riñones, glándula mamaria y sistema gastrointestinal (Gavier-Widen et al., 2001. Palmer et al., 2003). Abscesos externos pueden ser también una fuente de infección para una amplia variedad de mamíferos domésticos y salvajes (Bengis et al., 1996).

Dadas las consecuencias que causa la infección por *M. bovis* en la salud pública, la epidemiología de la enfermedad ha sido de gran interés. Epidemias de infección por *M. bovis* así como infecciones endémicas han sido reportadas en poblaciones de animales. La epidemia se caracteriza por el incremento de la infección en un período corto de tiempo dentro de una población de animales. Sin embargo es posible que la enfermedad se extienda de manera relativamente lenta, dependiendo del progreso de la enfermedad en el animal infectado y de la oportunidad de contacto con otros animales. Las infecciones endémicas se caracterizan por las bajas tasas de infección y también han sido reportadas en poblaciones de animales. La extensión de la enfermedad no afecta suficientemente la supervivencia de la población, pero si es suficiente para que la transmisión de la infección esté de manera continua dentro de la misma (Clifton-Hadley., 1996).

A causa de la gran cantidad de especies susceptibles, la diferencia en la patogénesis, y la variedad de los posibles mecanismos de transmisión, combinadas con la falta de una vacunación efectiva y métodos de diagnóstico moderadamente veraces, la tuberculosis bovina puede ser difícilmente

controlable. En tal situación se deben aplicar manejos para la enfermedad capaces de controlar la infección de manera efectiva (LoBue et al., 2003).

Al infectar ganado bovino de manera experimental por vía respiratoria y digestiva se ha comparado las lesiones observadas con las lesiones de los animales infectados de manera natural y se ha encontrado que entre el 80-90% se infectaron por inhalación. La lesión más frecuentemente encontrada es un foco bronconeumónico en pulmón y lesión en el ganglio linfático correspondiente (complejo primario) (Pritchard .,1988).

Los animales en la primera fase de la enfermedad y antes del desarrollo de lesiones visibles, contribuyen notablemente a la producción de aerosoles infectivos. Investigaciones dieron como resultado que existe una relación inversamente proporcional entre la dosis infectante y el tiempo que transcurre hasta la liberación por vía respiratoria de *M. bovis*, y que en las infecciones naturales la eliminación del bacilo comienza a los 87 días de la infección, ocurriendo en algunos casos en ganado negativo a la tuberculina (Neill et al., 1992).

Los primates no humanos son también susceptibles a la infección por *M. bovis* y *M.tuberculosis*, habiéndose notificado también infecciones por *M. africanum*. La infección aparece raramente en animales libres, aunque se han reportado animales infectados debido a la ingestión de carcasas procedentes de ganado tuberculoso (Tarara et al., 1985). Sin embargo, en cautividad la incidencia de tuberculosis en estos animales es extremadamente alta y han sido comunicados varios brotes de enfermedad en zoológicos y animalarios, jugando la vía aerógena un importante papel (Wilson et al., 1984, McMurray., 2000, Greenwald., 2007).

El ganado caprino es muy susceptible a la tuberculosis. Aunque en un estudio sobre morfopatología de las lesiones presentadas por estos animales se concluyó que eran similares a las encontradas en el ganado bovino. La prevalencia de la enfermedad es desconocida en la mayoría de los países ya que sólo se han realizado estudios aislados sobre la misma (Bernabé et al.,

1991), estos animales presentan lesiones más caseificadas y un menor número de bacilos ácido-alcohol resistente detectable por microscopía. Un estudio posterior reveló también diferencias histológicas entre las lesiones encontradas en caprinos y bovinos (Gutiérrez y garcía Marín., 1993).

Una de las razones es por la naturaleza de los sistemas de explotación de este ganado que limita el contacto con bovinos infectados, y por otra parte el comportamiento desconfiado que hace improbable el contacto con reservorios moribundos o sus cadáveres. Otro factor que puede contribuir a la escasa notificación de casos en esta especie es que las lesiones que presentan son muy similares a las de una linfadenitis caseosa y los bacilos ácido-alcohol resistentes son muy escasos y difíciles de encontrar (Cordes et al., 1981. Morris et al., 1994).

El cerdo es susceptible a la infección por *M. bovis*. La transmisión ocurre generalmente por vía digestiva por el consumo de leche, resto de animales muertos infectados o heces de bovinos tuberculosos. La transmisión entre cerdos es poco importante ya que las lesiones normalmente son localizadas y los animales se sacrifican a edad temprana. También se han encontrado jabalíes con tuberculosis pero se cree que se infectaron al consumir cadáveres de bovinos tuberculosos (Morris et al., 1994).

En caballos y asnos es poco frecuente, aunque posible. La enfermedad cursa con una mortalidad muy elevada y las lesiones son de aspecto tumoral (O'Reilly and Daborn., 1995).

En perros y gatos la tuberculosis puede causarla tanto *M. bovis* como *M. tuberculosis* aunque los gatos son más susceptibles a *M. bovis* y los perros a *M. tuberculosis*, la infección la adquieren por vía digestiva o aerógena (Aranaz et al., 1996).

Así mismo la tuberculosis es una enfermedad que afecta a los cérvidos. La distribución de las lesiones en estos animales nos indica que tanto la vía respiratoria como la vía digestiva son importantes en la transmisión de la

enfermedad (Morris et al., 1994). En ellos es típica la formación de lesiones extensivas de desarrollo rápido y frecuentemente se forman abscesos. Esto da origen a un aumento de la probabilidad de la transmisión del agente en un rebaño y es un riesgo para otros animales y el hombre (Clifton-Hadley y Wilesmith., 1991). La enfermedad constituye un problema económico y sanitario en los rebaños de ciervos domésticos en Nueva Zelanda, Dinamarca y Reino Unido, países en donde se lleva a cabo un programa de erradicación de la enfermedad. También presenta importancia en los rebaños de Canadá y Estados Unidos, originando problemas de erradicación de la tuberculosis bovina (Fanning y Edwards., 1991).

La tuberculosis es una enfermedad endémica en las poblaciones de búfalos del norte de Australia (Hein and Tomasovic.,1981), ha sido descrita también en búfalos de Uganda (Woodford., 1982), Sudáfrica, Egipto e India (O'Reilly y Daborn., 1995). Las lesiones encontradas en estos animales afectaron a los órganos torácicos, lo cual sugiere que la vía de transmisión en estos animales es la aerógena, debido a los hábitos de comportamiento ya que deambulan en grandes rebaños con una alta densidad de animales. Lo mismo ocurre en las poblaciones de bisontes de Canadá y Estados Unidos (Tessaro et al., 1990).

Mamíferos de la familia *Camelidae* (camellos, dromedarios, llamas, alpacas, vicuñas) y otros rumiantes exóticos (antílope, órix, etc) son también susceptibles a la infección por *M. bovis* y son un riesgo potencial para la transmisión del agente al ganado bovino, por ello se recomienda limitar al máximo el contacto entre especies y extremar las medidas de cuarentena en las importaciones de estos animales (O'Reilly y Daborn., 1995).

Los tejones están distribuidos en el continente europeo y no parecen representar problemas a los esquemas de erradicación de la tuberculosis con excepción en el Reino Unido e Irlanda, ya que la tuberculosis es endémica en la población de los tejones. En estos dos países el tejón actúa como reservorio para *M. bovis*; los tejones pueden vivir largo tiempo con la infección tuberculosa sin que se afecte la población de manera importante. La vía principal de

contagio es la vía aerógena. En consecuencia se realizan distintas estrategias para controlar la tuberculosis en el tejón, desde la vacunación hasta la eliminación de los tejones (especie protegida) de los entornos de las explotaciones ganaderas. Vicente et al, (2007) sugieren que la eliminación de tejones no es una respuesta adecuada al problema ya que puede aumentar el movimiento de estos animales y contribuir a la extensión de la infección (Vicente et al., 2007).

Pruebas diagnósticas para la detección de tuberculosis bovina

Existen diversas estrategias para combatir la tuberculosis bovina, el diagnóstico oportuno, es de los pilares más importantes, ya que permite minimizar los riesgos de contagio y dispersión de la enfermedad. La identificación de la micobacteria ha sido efectuada determinando su habilidad para utilizar sus componentes, sus características de crecimiento y su morfología.

Examen postmortem e histopatología

El detectar lesiones macroscópicas en el examen postmortem es una orientación en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Las lesiones tuberculosas pueden variar de 1 mm a 10 cm de diámetro, y puede tratarse de lesiones localizadas en un ganglio linfático o de complejos primarios. En un estudio sobre lesiones sospechosas de tuberculosis se encontraron que solo el 81% de las lesiones macroscópicas sospechosas, son realmente lesiones tuberculosas al ser confirmadas histopatológicamente. Varios autores han demostrado las deficiencias de la inspección postmortem de animales infectados (Corner et al., 1990).

En cuanto la histopatología se ha utilizado como una técnica para confirmar el diagnóstico en aquellas lesiones sospechosas de tuberculosis en varios países, pero algunas micobacterias atípicas pueden producir lesiones localizadas que son macroscópica e histopatológicamente indiferenciables de aquellas causadas por *M. bovis*. Estas infecciones pueden causar

sensibilización a la tuberculina bovina, lo cual provoca problemas en los esquemas de control de la enfermedad. Además de las micobacterias atípicas, otras infecciones como la actinobacilosis (*Actinobacillus lignieresii*), actinomicosis (*Actinomyces bovis*), botriomicosis (*Staphilococcus aureus*), nocardiosis (*Nocardia spp*), estreptomicosis (*Streptomyces spp*) y las lesiones causadas por *Rhodococcus equi*, pueden tener el aspecto característico de una reacción granulomatosa y pueden confundirse con tuberculosis (Tammemagi et al., 1973).

Las lesiones causadas que pueden servirnos como diagnóstico diferencial es que las lesiones causadas por *Rhodococcus* presentan macrófagos cargados con cocobacilos Gram positivos. Las originadas por *Nocardia-Streptomyces* presentan numerosas células gigantes de cuerpo extraño y neutrófilos asociados con el área necrótica, las ocasionadas por *Actinomyces-Actinobacillus* presentan filamentos radiados y colonias en forma de bastón (Tammemagi et al., 1973, Corner et al., 1990).

Cultivo microbiológico

El aislamiento del agente causal es aún la confirmación de la infección por lo que cualquier método diagnóstico nuevo debe ser contrastado con la bacteriología. Para la confirmación de la infección por *M. bovis* generalmente son necesarios 2-3 meses. El cultivo se realiza asociando tres pasos básicos: suspensión, concentración, y descontaminación de las muestras con ácidos, álcalis o detergentes con el fin de eliminar otras bacterias y hongos que impedirían el crecimiento de las micobacterias. La sensibilidad del cultivo aumenta al incrementar la cantidad del material cultivado. También el número de colonias obtenido en los medios con base de huevo es mayor, y estos medios son menos susceptibles a la contaminación (Petran y Vera., 1971). A la mayoría de estos medios de cultivo se les adicionan colorantes como verde malaquita, cristal violeta o diferentes antibióticos (Mitchison et al., 1973), aunque se ha observado inhibición de las micobacterias algunas veces por lo que se utilizan solo en muestras muy contaminadas. Los antibióticos con los que se han obtenido mejores resultados son el agar mycobactosel con

cicloheximida, lincomicina y ácido nalidíxico (Petran y Vera., 1971), y el Middelbrook 7H11 con polimixina B, carbenicilina, anfotericina B, trimetoprim, 1 –hexadecylpyridinium clorhidre (HPC) para el control del crecimiento de contaminantes (Mitchison et al., 1973, Corner et al., 1988, Corner and Trajstman., 1995)

Se ha encontrado que la sensibilidad del cultivo respecto a lesiones confirmadas histopatológicamente es de aproximadamente 80% (Tammemagi et al., 1973). Wood et al., en 1991 encontraron que sólo el 81% de los animales con lesiones macroscópicas sospechosas de tuberculosis pudieron ser confirmadas como infectados por *M. bovis* mediante cultivo. En otros trabajos se ha estimado que la sensibilidad del cultivo en la práctica es de 102 bacilos/ml de muestra (McAdam et al., 1990).

Prueba de la tuberculina

Una de las pruebas diagnosticas más utilizadas en la mayoría de los países inclusive a nivel oficial, es la prueba de la tuberculina. Esta prueba se basa en la respuesta inmunológica del animal a la inyección intradérmica. Antes se utilizaba tuberculina de medio sintético concentrada por calor (HCSM), pero en la mayoría de los países la tuberculina HCSM se ha reemplazado por tuberculina derivada de proteínas purificadas (PPD). La tuberculina HCSM puede tener una buena potencia si se estandariza de modo correcto en cuanto a actividad biológica, pero su especificidad es inferior a las tuberculinas PPD. Además, se ha visto que las PPD bovinas preparadas de la cepa AN5 de *M. bovis* son más específicas para detectar la tuberculosis bovina que las PPDs humanas preparadas con *M. tuberculosis*.

El método estándar para la detección de la tuberculosis bovina, comprende la inyección intradérmica de tuberculina PPD bovina y la consiguiente detección de la inflamación (Hipersensibilidad retardada) en el sitio de la inoculación tres días después. Esto se puede llevar a cabo utilizando sólo tuberculina bovina o, en una prueba comparativa, con tuberculina aviar y bovina. Normalmente la prueba se realiza en medio del cuello, pero también se

puede llevar a cabo en el pliegue caudal de la cola. La piel del cuello es más sensible a la tuberculina que la de la cola. Para compensar esta diferencia, se pueden utilizar mayores dosis de tuberculina en la cola (Manual de la OIE., 2004).

No se recomienda utilizar esta prueba cuando la epidemiología sugiere que la población o el animal han estado en contacto con animales infectados, ya que puede originar respuestas falsas negativas y un descenso en la sensibilidad de la prueba. Si sólo se utiliza una prueba de tuberculina, la erradicación completa resulta difícil ya que puede haber falsas negativas en la fase inicial de la enfermedad y en animales con infección grave.

La prueba intradérmica comparativa de la tuberculina se utiliza para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina bovina por exposición a otras micobacterias. Esta sensibilización se debe a la gran reactividad cruzada existente entre especies de micobacterias y géneros relacionados. La prueba consta de la inyección intradérmica de tuberculina bovina y de tuberculina aviar en sitios diferentes, por lo general en el mismo lado del cuello, y se mide la respuesta tres días después (Manual de la OIE., 2004, NOM-031-ZOO-1995).

La potencia de las tuberculinas debe estimarse por métodos biológicos mediante comparación con tuberculinas estándar y debe expresarse en unidades internacionales (UI). En varios países se considera que la tuberculina tiene una potencia adecuada si garantiza al menos 2.000 UI ($\pm 25\%$) por dosis en el ganado bovino. En los animales con una sensibilidad alérgica reducida se necesita una dosis mayor de tuberculina, y en campañas nacionales de erradicación se recomiendan hasta 5.000 UI. El volumen de cada inyección no debe superar los 0,2 ml (NOM-031-ZOO-1995).

Es importante una técnica de inyección correcta. Deben afeitarse y limpiarse los sitios de inyección. Dentro de cada área afeitada se mide un pliegue de la piel con calibradores y se marca el sitio antes de la inyección. Se inserta oblicuamente en las capas más profundas de la piel una aguja corta con

el bisel hacia arriba y una jeringuilla graduada. La dosis no debe contener menos de 2.000 UI de tuberculina bovina o aviar. Debe palparse una pequeña protuberancia en el sitio de la inyección. La distancia entre dos inyecciones debe ser aproximadamente de 12-15 cm. En animales jóvenes donde no hay espacio para separar suficientemente los sitios de un lado del cuello, se aplica una a cada lado del cuello a la misma altura (tercio medio del cuello). Setenta y dos horas después se mide el grosor de la piel doblada en cada sitio de la inyección. La medida de la piel, antes de la inyección y cuando se lee la prueba, de preferencia debe hacerlo la misma persona que aplica la prueba (NOM-031-ZOO-1995).

La interpretación se basa en la observación y los incrementos en el grosor de la piel anotados. En la prueba intradérmica simple (que implica una sola inyección de tuberculina bovina), se considera que la prueba es negativa si sólo se observa una inflamación limitada, con un incremento menor de 2 mm y sin síntomas clínicos, del tipo de edema difuso o extendido, exudado, necrosis, dolor o inflamación de los vasos linfáticos de esa región o de los ganglios linfáticos. La reacción no es concluyente si no se observa ninguno de éstos síntomas y, si el incremento en el pliegue de la piel oscila entre 2 y 4 mm o más en el grosor de la piel. Sin embargo, en poblaciones infectadas por *M. bovis*, cualquier inflamación palpable o visible debe considerarse positiva. A veces se emplea una interpretación más rigurosa, en particular en poblaciones de alto riesgo o en animales en contacto. Los animales con resultados no concluyentes por una prueba intradérmica sencilla deben someterse a otra prueba con un intervalo de 42 días. Los animales que no son negativos en esta segunda prueba deben ser considerados positivos. Los animales positivos en la prueba intradérmica sencilla pueden ser sometidos a una prueba intradérmica comparativa. La repetición de las pruebas se puede realizar conforme a los programas nacionales o locales de control (Manual de la OIE., 2004, NOM-031-ZOO-1995).

En la interpretación de la prueba intradérmica comparativa, se considera positiva la reacción, si el aumento del grosor de la piel en el sitio de la inyección bovina supera los 4mm o más. La reacción no es concluyente, si el incremento

comparativo está entre 1 y 4mm, y se considera negativa, si el incremento del grosor de la piel en el sitio de la inyección bovina es menor o igual que el observado en el sitio de la inyección aviar. Este esquema de interpretación se utiliza en los países de la Unión Europea (EUROPEAN COMMISSION .2000, Manual de la OIE., 2004).

En la prueba ano caudal, se inserta oblicuamente en las capas más profundas de la piel una aguja corta con el bisel hacia afuera, en la cara lateral del pliegue ano caudal, entre la línea del pelo y la cara ventral del pliegue. La interpretación estándar es que cualquier cambio palpable o visible en el sitio de la inyección que tenga un aumento diferencial de grosor de 4 mm en comparación con el pliegue caudal opuesto (Manual de la OIE., 2004).

Pruebas de laboratorio basadas en sangre

Además de la prueba de tuberculina, histopatología y cultivo microbiológico, se dispone de varias pruebas diagnósticas sanguíneas, pero debido al costo y naturaleza más compleja de las pruebas de laboratorio, se usan como pruebas de apoyo para confirmar o negar los resultados de la prueba intradérmica. IFN- γ detecta a la inmunidad celular y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) detecta la inmunidad humoral.

Prueba de gamma Interferón

La prueba se basa en la liberación de gamma interferón por linfocitos sensibilizados durante un período de incubación de 16-18 horas con un antígeno específico (tuberculina PPD). Esta prueba compara la producción de gamma interferón tras la estimulación de PPD bovino y PPD aviar. La cuantificación de interferón gamma se realiza por un ELISA “en sándwich” que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra el interferón gamma bovino.

La liberación de linfocinas a partir de linfocitos T puede ser medida directamente. Una de las linfocinas es el gamma- interferón (IFN- γ) el cual interviene en los mecanismos de defensa frente a la tuberculosis ya que es un

activador del metabolismo de los macrófagos. Los niveles de IFN- γ circulantes en animales son prácticamente nulos, sin embargo cuando se instaura una respuesta de tipo celular específica frente a un determinado antígeno, sus niveles aumentan de manera importante.

Wood et al., 1990b describieron una prueba *in vitro* para el diagnóstico de la tuberculosis bovina basado en la detección de IFN- γ . Posteriormente se produjeron y caracterizaron una serie de anticuerpos monoclonales frente al IFN- γ bovino (Wood et al., 1990a) y se desarrollo un ELISA para la detección de IFN- γ liberado después de la estimulación *in vitro* con antígenos tuberculínicos de los linfocitos sensibilizados (Rothel et al., 1990).

Al establecer las condiciones ideales para el cultivo de la sangre antes del ELISA para detectar IFN- γ , encontraron que era necesario recoger la sangre en heparina (los demás anticoagulantes inhiben la reactividad de los linfocitos), y que esta debe ser mantenida a temperatura ambiente hasta su cultivo (Black et al., 2003).

En esta prueba la sangre debe ser mantenida a temperatura ambiente hasta su cultivo. Este se realiza en las primeras 8 horas de recogida la muestra. Se cultiva la sangre entera con PBS (control) PPD bovino y PPD aviar durante un período de 16-24 horas a 37⁰c de temperatura. Posteriormente se extrae el plasma y se somete a un ensayo ELISA de captura para IFN- γ bovino utilizando anticuerpos monoclonales contra esta citocina. La infección se determina cuando el pocillo con PPD bovino estimula más IFN- γ que el pocillo control y que el pocillo PPD aviar. En Australia se adoptó esta técnica oficialmente en las etapas finales del programa de erradicación, esta prueba al conjuntarse con la IDTB mejora de manera importante su sensibilidad alcanzando valores del 95% (Wood et al., 1991).

Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Esta prueba se fundamenta en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (peroxidasa), de manera que los conjugados resultantes tengan

actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) sobre la placa, la reacción antígeno anticuerpo queda inmovilizada y por tanto, se revela mediante la adición de un sustrato, que al actuar sobre una enzima, produce un color que se observa a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro, todo este proceso se lleva a cabo en una placa de polipropileno, la cual tiene adherido el antígeno o el anticuerpo, según lo que se vaya a determinar.

Con el fin de detectar animales anérgicos en los casos de enfermedad avanzada, en los que existe la sospecha de animales falsos negativos a la IDTB. Griffin et al, (1991) confirmaron la idea de que las pruebas para la detección de anticuerpos son más efectivas en el diagnóstico de aquellos animales que se encuentran en fases proliferativas de la enfermedad (animales que suelen ser negativos a IDTB), aunque también se han encontrado animales negativos a pruebas ELISA en animales a los que se les aplicaron dos pruebas para medir la inmunidad celular (Wood et al., 1992). Otra de las limitaciones que provoca una baja sensibilidad del ELISA es la existencia de un intervalo de tiempo entre la infección y la seroconversión, con lo que los animales en estadios tempranos de la infección no son detectados (Plackett et al., 1989, Ritacco et al 1991).

Métodos de reconocimiento de ácido nucleico

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha evaluado ampliamente para la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas de pacientes humanos (principalmente esputos) y recientemente se ha utilizado para el diagnóstico de tuberculosis en animales. Para la detección del complejo *M. tuberculosis* en tejidos frescos y fijados se han evaluado varios preparados disponibles comercialmente y diversos procedimientos “caseros”. Se han utilizado varios cebadores, incluyendo los que amplifican secuencias del ARNr 16S-23S, de las secuencias de inserción IS6110 e IS1081, y de los genes que codifican las proteínas específicas del complejo *M. tuberculosis*, como la MPB70 y el antígeno b de 38 kDa. Se han analizado los productos amplificados por hibridación con sondas o por electroforesis en gel. Las

preparaciones comerciales y los procedimientos caseros han demostrado resultados variables y poco satisfactorios en comparaciones entre laboratorios con tejidos frescos, congelados o conservados en ácido bórico. La fiabilidad de esta prueba se ha reducido por los resultados falsos positivos y negativos, sobre todo en muestras con un número bajo de bacilos. Se ha atribuido la variabilidad de los resultados a un número bajo de copias de la secuencia amplificada junto al bajo número de bacilos. También se cree que es debida a los métodos de descontaminación, a los procedimientos de extracción del DNA, a las técnicas para eliminar a los inhibidores de la polimerasa, a controles internos y externos, y a los procedimientos seguidos para evitar contaminaciones cruzadas. Para mejorar la fiabilidad de la PCR como prueba práctica de detección del complejo *M. tuberculosis*, se necesita el desarrollo de procedimientos sólidos y estandarizados ya que la PCR no se utiliza solo para la detección directa en la muestra sino para la caracterización de la muestra o la diferenciación dentro del complejo TB (Noredhoek et al., 1996).

PCR, es la prueba de oro para el diagnóstico de TB en fluidos corporales (Lodha and Kabra., 2004); también, se ha utilizado esta técnica para detectar las cepas de *M. tuberculosis* resistentes y para identificar el complejo *M. tuberculosis* (Herrera-Leon et al., 2005).

La espoligotipificación es un método basado en PCR capaz de analizar los polimorfismos dependientes de las cepas en la región cromosomal de repetición corta directa, la cual consiste generalmente de repeticiones idénticas (Jou et al., 2005).

Prueba de flujo lateral

La prueba de flujo lateral (FL) es una prueba utilizada para detectar Ac's que fue desarrollada por Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY, para detectar anticuerpos de tres isotipos (IgM, IgG e IgA). La prueba emplea un coctel de seis antígenos seleccionados de *M. bovis* que incluye MPB83, ESAT-6 y CFP-10 listo para usar (Waters et al., 2006). El dispositivo consiste en un cassette de plástico que contiene una membrana de nitrocelulosa en forma de

tira impregnada con el antígeno y varias capas de fibra de vidrio y celulosa. La prueba se realiza agregando 30µl de suero y tres gotas de diluyente en el cojincillo, esto se realiza de manera secuencial. Ya diluido el suero este migra a través de la membrana de látex en la que están adheridos los antígenos y si existen anticuerpos en la muestra de suero estos se unen a los antígenos creando un inmunocomplejo que va a poder observarse en forma de línea de color azul. Esto se debe a las fuerzas de capilaridad que provocan que este complejo fluya a través de la membrana de nitrocelulosa y se una a los antígenos inmovilizados, de esta manera se produce una banda de color azul en el área de prueba del dispositivo. Si no existen anticuerpos la banda no se desarrolla en el área de prueba. El líquido continúa migrando a lo largo de la membrana produciendo una línea similar en el área de control del dispositivo independiente de la presencia de anticuerpos específicos en el suero de prueba. Con esto se demuestra que los reactivos de la prueba están funcionando apropiadamente. Los resultados se leen en 20 minutos. Cualquier línea visible en el área de prueba, junto con la línea de control es considerada positiva a anticuerpos mientras que si no hay una banda visible en el área de prueba además de la línea control que debe estar visible se considera negativo el resultado (Wernery et al., 2007).

Esta prueba se ha realizado para detectar tuberculosis bovina en elefantes (Lyashchenko et al., 2006), así mismo se realizó una investigación de un brote de tuberculosis en dromedarios en el cual se muestrearon 57 dromedarios por medio de la prueba de tuberculina resultando reactores tres animales posteriormente se les realizó la prueba de flujo lateral y los mismos reactores resultaron positivos los dos que resultaron fuertemente reactores fueron sacrificados y a la necropsia se observaron lesiones típicas de tuberculosis aún cuando estos animales no presentaban signos clínicos de la enfermedad (Wernery et al., 2007). Así mismo en otro estudio realizado en bovinos en los cuales se utilizó Vet TB STAT-PAK test esta prueba detectó el 60% de bovinos infectados (15/25) de manera experimental a las siete semanas de infectados con *M. bovis*, a las 18 semanas postinfección se detectaron 96% (24/25), estos hallazgos demostraron el potencial de esta

prueba de nueva generación como una herramienta útil para la detección temprana de ganado infectado con *M. bovis* (Waters et al., 2006)

MATERIALES Y METODOS

Lugar del estudio

La detección de ganado bovino sacrificado con lesiones sugestivas de tuberculosis se llevó a cabo en el rastro del grupo QUADRUN ubicado en Río Suchiate 9650 col. Marrón C.P. 22400 Tijuana, B. C. México, el cual cuenta con un médico veterinario zootecnista, un inspector de SAGARPA y personal encargado del proceso de sacrificio

Inspección post-mortem

La inspección postmortem se llevó a cabo en órganos, tejidos, y ganglios linfáticos en las regiones de la cabeza y tórax. El proceso de inspección estuvo a cargo del veterinario responsable de la SAGARPA.

Toma de muestras

Muestras de ganglios linfáticos, órganos y tejidos con lesiones sugestivas de tuberculosis de aproximadamente 2.5 cms, fueron depositadas en un recipiente con formol al 10% (80 ml aprox.) en una proporción de 1:10, para realizar estudios histopatológicos. Para la prueba de flujo lateral se tomaron en tubos muestras de sangre de los mismos animales. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California para llevar a cabo estudios bacteriológicos.

Estudios bacteriológicos

Las muestras se analizaron de acuerdo al método simplificado recomendado por Jarnaguin y Payeur (1989), con las siguientes modificaciones: se utilizó como medio de cultivo primario Lowenstein-Jensen comercial en lugar de Herrold egg y para la identificación el medio Lowenstein-Jensen al 5% de NaCl en lugar de Middlebrook 7H10 al 5% de NaCl. El método de identificación se basó en el tiempo de aparición de colonias, presencia o

ausencia de pigmento con luz y sin luz, crecimiento en medio Proskauer y Beck (P&B), formación y tipo de cordón, producción de niacina y tolerancia al cloruro de sodio al 5%. Porciones de lesiones de 1cm² fueron colocados en un recipiente de plástico con 10 ml de caldo nutritivo Rojo Fenol al 0.04%, la muestra fue licuada durante dos minutos. Aproximadamente, 7 ml de esta suspensión fueron depositados en un tubo de 50 ml estéril con tapón de rosca, a la cual se le agregaron 5 ml de solución 0.5 normal de hidróxido de sodio (tratamiento). Las muestras se dejaron reaccionar durante 8 minutos con el álcali. Después se neutralizó con una solución al 6 N de HCl hasta que la mezcla cambió a un color amarillo (18-20 gotas). El pH final se ajustó a 7, mediante la adición de 3 a 4 gotas de una solución de 1 N de NaOH hasta obtener un cambio de color a rosa pálido. Este procedimiento se repitió con cada una de las muestras, las cuales se centrifugaron a 1650 x g. durante 20 minutos para permitir la concentración de las micobacterias presentes. El 90% del sobrenadante se descartó y con el resto se inoculó el medio de cultivo Stonebrick. Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 8 semanas y examinados a intervalos de una semana (Jarnaguin y Payeur, 1989). Una vez detectada la colonia sospechosa en el medio de cultivo primario, está se confirmó como bacilo ácido alcohol resistente por medio de la tinción de Ziehl Neelsen (ZN). Una porción de la colonia se tomó con un palillo estéril y se inoculó en un tubo de caldo Dubos Tween Albumina (DTA), el cual se incubó a 37°C durante 8 semanas. Los tubos fueron observados cada 7 días para ver la apariencia del crecimiento y pigmentación (Jarnagin y Payeur, 1989).

Prueba de Flujo Lateral

Para la prueba de flujo lateral se utilizó el suero de la sangre que se recolectó en tubos estériles de un total de 556 bovinos holstein lecheros que, para obtener el suero se centrifugaron los tubos diez minutos a 2000 rpm. Para realización de la prueba se utilizaron cassetes donados por Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY. La prueba se realizó agregando 30 µl de suero y tres gotas del diluyente en el cojincillo indicado, de manera secuencial. Ya diluido el suero migró a través de la membrana de látex en la que están adheridos los antígenos, los anticuerpos de la muestra de suero se unieron a los antígenos creando un inmuno complejo que pudo observarse en forma de línea de color azul en las muestras que resultaron positivas. En las que resultaron negativas solo se formó la línea azul en el área de control.

Análisis estadístico

Para determinar la bondad entre las pruebas de diagnóstico (bacteriología y Flujo lateral) se calcularon las tasas de sensibilidad y especificidad mediante la tabla de contingencia de 2 X 2, utilizando el programa Epi info 6 (CDC, Atlanta, USA).

RESULTADOS

De los 556 animales incluidos en el estudio, 217 dieron positivo a histopatología con tinción eosina Hematoxilina así como a la presencia de bacilos ácido resistentes utilizando la tinción de Ziehl Neelsen. De los 217 positivos a microscopia el 40% (85) fueron positivos a cultivo bacteriológico mientras que el 60% (132) fueron negativos. La prueba de flujo lateral detectó 98 animales positivos y 119 negativos. Las pruebas únicamente concordaron en el diagnóstico positivo de 37 animales, dando una sensibilidad del 43% y una especificidad de 53.8%.

Cuadro 1. Determinación de la sensibilidad y especificidad entre las pruebas de diagnóstico Bacteriológico y Flujo lateral

	Bacteriología			
		Positivo	Negativo	Total
Flujo lateral	Positivo	37	61	98
	Negativo	48	71	119
	Total	85	132	217

Sensibilidad = 43%; Especificidad = 53.8%

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó una evaluación entre la prueba de flujo lateral y la prueba de bacteriología (prueba de oro) para determinar la sensibilidad y especificidad. La prueba de flujo lateral puede convertirse en una herramienta útil para su aplicación en campo ya que es una prueba simple, rápida y económica. Esta prueba detecta anticuerpos específicos de tres clases principales IgM, IgG e IgA (Lyashchenko et al., 2008). En nuestro estudio la

sensibilidad y especificidad fue del 43% y 53.8% respectivamente. Estos resultados coinciden proporcionalmente con respecto a la sensibilidad pero no en la especificidad reportada por Greenwald et al., 2003 donde aplicaron esta prueba a 178 tejones de los cuales 78 fueron positivos a tuberculosis y 100 negativos, donde se obtuvo una sensibilidad de 52.6% y una especificidad de 95%. En otro estudio donde se evaluó esta prueba en diferentes especies de animales infectados de manera natural (n=1532) donde se obtuvo una sensibilidad de 50.7% y una especificidad 93.1% en tejones; en zarigüeyas (n=129) se presentó una sensibilidad 44.7 y una especificidad 85.7; y en jabalíes (n=177) tuvieron una sensibilidad 76.6% y una especificidad 89.8% (Lyaschenko et al., 2008). Cuando se utilizó esta prueba en ganado bovino infectado de manera experimental, el comportamiento de la sensibilidad se incrementó a un 96% (Waters et al., 2006). Resultados similares obtuvieron Lyaschenko et al., 2008, quienes observaron que al aplicar la prueba de flujo lateral en ciervos que fueron infectados experimentalmente, la sensibilidad fue del 75.0% y la especificidad de 98.9%.

Como se puede observar en los trabajos antes reportados, el bajo comportamiento de la sensibilidad es proporcionalmente muy similar cuando se utiliza esta prueba en animales que son infectados de manera natural. Sin embargo, cuando se utiliza en para el diagnóstico en animales que son infectados de manera experimental la sensibilidad y especificidad incrementan sustancialmente. El resultado de numerosos esfuerzos para desarrollar una prueba serodiagnóstica sensible y específica para el diagnóstico de tuberculosis bovina en campo no ha sido satisfactoria, como se muestra en este trabajo. El progreso de este tipo de pruebas serodiagnósticas requiere de tener un entendimiento detallado de los mecanismos inmunohumorales inducidos por la infección con *M. bovis* en ganado bovino e identificación de los antígenos involucrados en las respuestas de los anticuerpos durante la tuberculosis bovina (Lyashchenko et al., 1998).

LITERATURA CITADA

- Adler H., B. Frech, M. Thony, H. Pfister, E. Peterhans and T. W. Jungi. 1995. Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J. Immunol.* 154: 4710-4718.
- Alfredsen S., and F. Saxegaard. 1992. An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum*. *Vet. Rec.* 131:51-53.
- Aranaz A., E. Liébana, P. Pickering, C. Novoa, A. Mateos and L. Domínguez. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) procedures in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *The Veterinary Record* 138:276-280.
- Armstrong and Hart. 1975. Phagosome-Lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli reversal of the usual nonconfusion pattern and observations on bacterial survival. *J. Exp. Med.* 142:1-16.
- Black G. F., R. E. Weir. 2003. Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in health, non *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated Malawian young adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(4):602-611.
- Banchureau J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673): 245-252.
- Bengis R. G., N. P. J. Kriek, D. F. Keet, J. P. Raath, V. de Vos and H. F. A. K. Huchzermeyer. 1996. An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer-sparrman*) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 63:15-18.
- Bernabé A., M. A. Gómez, J. A. Navarro, S. Gómez, J. Sánchez, J. Sidrach

- and V. Menchén. 1991. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Research*. 5(4):377-390.
- Chan J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan and B. R. Bloom. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Micobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 59: 1755-1761.
- Chan J., Y. Xing, R. S. Magliozzo and B. R. Bloo. 1992. Killing of virulent *mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediate produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175:1111-1122.
- Chen J.M., D. J. German, D.C. Alexander, H. Ren, T. Tan and J. Liu. 2006. Roles of Lsr2 in calory morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacterial.* 188(2): 633-641.
- Choi H. S., P. R. Rai, H. W. Chu, C. Cool and E. D. Chan. 2002. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 166(2): 178-186.
- Clifton-Hadley R. S. 1996. Badgers, bovine tuberculosis and the age of reason. *Br. Vet. J.* 152:243-246.
- Clifton-Hadley R. S. and J. W. Wilesmith. 1991. Tuberculosis in deer: a review. *The Veterinary Record* 129 (1): 5-12.
- Cordes D. O., J. A. Bullians, D. E. Lake and M. E. Carter. 1981. Observations on tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in sheep. *New Zeland Veterinary Journal* 29:60-62.
- Corner L. A., L. Melville, K. McCubbin, K. J. Small, B. S. McCormick, P. R. Wood and J. S. Rothel. 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67:

389-392.

- Corner L. A. and A. C. Trajstman. 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chlorhidre as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. Vet. Microbiology. 18(2): 127-134.
- Corner L. A., A. C. Trajstman and K. Lund. 1995. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. New Zeland Veterinary Journal. 43:129-133
- Cousins D.V., B.R. Francis, R. Casey, C. Mayberry. 1993. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. Aust. Vet. J. 70: 262-263.
- Cousins D.V., B. R. Francis, B. L. Gow, D. M. Collins, C. H. McGlashan, A. Gregory and R.M. MacKenzie. 1990. Tuberculosis in captive seals: bacteriological studies on an isolate belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Research in Veterinary Science. 48:196-200.
- Delahay R. J., A. N. S. De Leeuw, A. M. Barlow, R. S. Clifton-Hadley and C. L. Cheeseman. 2002. The status of *Mycobacterium bovis* infection in Uk wild mammals: a review. Vet. J. 164: 90-105.
- EUROPEAN COMISSION 2000. reporte on trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuff, food and man in The European Union and Norway in 2000. Health and consumer protection Directorate-General Brucelas.
- Fanning A. and S. Edwards. 1991. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. The lancet 338: 1253-1255.
- Feng C. G., A. G. Bean, H. Hooi, H. Briscoe and W. J. Britton. 1999. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+) T cells in lungs following aerosol infection with *Micobacterium tuberculosis*. Infect Immun.

67(7): 3242-3247.

Francis J. 1971. Susceptibility to tuberculosis and the route of infection. Aust. Vet. J. 47:414.

Gavier-Widen D., M. A. Chambers, N. Palmer, D. G. Newell and R. G. Hewinson. 2001. Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. Vet. Rec. 148: 299-304.

Griffin J. F. T., S. Nagai and G. S. Buchan. 1991. Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. Research in Veterinary Science 50: (3): 279-285.

González O. R., C. B. Gutiérrez, D. Álvarez, V. A. de la Puente, L. Domínguez and E. F. Rodríguez. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculina test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. J. Veterinary Microbiology. 70:55-66.

Greenwald R., J. Esfandiari, S. Lesellier, R. Houghton, J. Pollok, C. Aagaard, P. Andersen, R. G. Hewinson, M. Chambers and K. Lyashchenko. 2003. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. Diagnostic Microbiology and infectious Disease. 46:197-203.

Greenwald R., K. Lyaschenko, J. Esfandiari, L. Stutzman, S. Gibson, P. Didier and C. McCombs. 2007. Prima-TBSTAT-PAK (R) assay a novel rapid test for tuberculosis in nonhuman primates. American Journal of Primatology. 69(suppl.1):120.

Gutiérrez M. and J. F. García- Marín. 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium*

- bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. Journal of Comparative Pathology. 109:361-370.
- Hart G., D. L. Clemens and M. A. Horwitz. 1994. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(20):9342-9346.
- Hein W. R. and A. A. Tomasovic. 1981. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. Australian Veterinary Journal 57: 543-547.
- Herrera-Leon L., T.Molina. 2005. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 49(1):144-147.
- Jarnagin, J.L., Payeur, J.B. 1989. A simplified System for Identification of Mycobacteria of Veterinary Interest in Developing Countries. Ames, Iowa. (USDA) USA.
- Jou R., C. Y. Chiang. 2005. Distribution of the Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J. Clin. Microbiology. 43:95-111.
- Kaufmann S.H.E..2003. Immune response to tuberculosis: experimental animals models. Tuberculosis. 83:107-111.
- Kraemer H. C., and D. A. Bloch. 1988. Kappa coefficients in epidemiology: an appraisal of a reappraisal. Journal of Clinical Epidemiology. 41: 959-968.
- Lagranderie M., M. A. Nahori, A. M. Balazuc, H. Kiefer-Biasizzo, J. R. Lapa, G. Milon, G. Marcha and B. B. Varga Ftig. 2003. Dendritic cells recruited to the lung shortly alter intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a tipe 1 cytokine production. Immunology. 108(3): 352-364.
- Lazarevic V., A. J. Myers, C. A. Scanga and J. L. Flynn. 2003. CD40, but not

CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol *M. tuberculosis* infection. *Immunity*. 19(6): 823-835.

Lepper A. W. D. and L. A. Corner. 1983. Naturally occurring mycobacteriosis of animals. In the biology of the mycobacteria: immunological and environmental aspects. Vol. 2 edited. By C. Ratledge and J. Stanford. London Academic Press.

Liébana E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Villafrancia, E. Gómez-Mampaso, J. Tercero, J. Alemany, G. Suárez, M. Domingo and L. Domínguez. 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:33-36.

Liébana E. R., R. M. Girvin, M. Welsh, S. D. Neill and J. M. Pollock. 1999. Generation of CD8 (+) T-Cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 67 (3): 1034-1044.

Lilenbaum W., J. C. Schettini, G. N. Souza, E. R. Ribeiro, E. C. Moreira and L. S. Fonseca. 1999. Comparison between a IFN- γ assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *J. Vet. Med.* 46: 353-358.

Lodha R. and S. K. Kabra. 2004. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. *Indian J. Pediatric.* 71(3):221-227.

LoBue P. A., W. Betancourt, C. Peter. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *Int. J. Tuberc Lung Dis.* 7:180-185.

Lyashchenko K. P., R. Greenwald, J. Esfandiari, M. A. Chambers, J. Vicente, C. Gortazar, N. Santos, M. Correa-Neves, B. M. Buddle, R. Jackson, D. J. O'Brien, S. Schmitt, M. V. Palmer, R. J. Delahay, W. R. Waters. 2008. Animal side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis*

infection in multiple species of free – ranging wildlife. *Veterinary Microbiology* 132:283-292.

Lyashchenko K. P., R. Greenwald, J. Esfandiari, J. H. Olsen, R. Ball, G. Dumonceaux, F. Dunker, C. Buckley, M. Richard, S. Murray, J. B. Payeur, P. Andersen, J. M. Pollock, S. Mikota, M. Miller, D. Sofranko, W. R. Waters. 2006. Tuberculosis in elephants: antibody responses to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:722-732.

Lyashchenko K. P., J. M. Pollok, R. Colangeli and M. L. Genaro. 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infection and immunity.* 11:5344-5349.

McAdam R. A. , P. W. M. Hermans, D. Van Sooligen, Z. F. Zainudin, D. Catty, J. D. A. Van Embden and J. W. Dale. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Molecular Microbiology* 4 (9): 1607-1613.

McDonough K. A., Y. Kress and B.R. Bloom. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *J. Infection and Immunity.* 61(7):2763-2773.

Makrousov I., T. Otten, M. Filipenko, A. Vyazovaya, E. Chrapov, E. Liashchenko, L. Steklova, B. Vyshnovsky and O. Naruskaya. 2002. detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, by a multiplex allelo-specific PCR assay targeting Kat C codon 315 variation. *J. Clin. Microbiol.* 40(7): 2509-2512.

Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004. Cap. 2.3.3.

McMurray N. David. 2000. A Nonhuman Primate Model For Preclinical Testing of New Tuberculosis Vaccines. *Clinical Infections Diseases.* 30: 5210-5212.

- McNeil, M. R. and P. D. Brennan. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol* 142:451-63
- Mitchinson D. A. , B. W. Allen and R. A. Lambert. 1973. Selective media in the isolation of tubercle bacilli from tissues. *Journal of Clinical Pathology* 26: 250-252.
- Morris R. S., D. U. Pfeiffer and R. Jackson. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology* 40:153-177.
- Muller I., S. P. Cobbold, H. Waldman and S.H.E. Kaufmann.1987. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and L y T-2+T cells. *Infection and Immunity* 55:2037-41.
- Nathan C. and M. V. Shiloh. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:8841-8848.
- Neill S. D., J. Hanna, D. P. Mackie and T. G. D. Bryson. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tract of skin test-negative cattle. *The Veterinary Record*. 131:45-47.
- Noredhoek G. T., J. D. A. Van Embden and A. H. J. Kolk. 1996. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2522-2525.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-095. Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*).
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-096. Campaña Nacional contra la

- Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). Diario oficial de la federación. DX 6:35. 1996.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017-ZOO-2005, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*)
- O'Reilly L. M. and C. J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle and Lung Disease (supplement): 1-46.
- Palmer M. V., W. R. Waters and D. L. Whipple. 2003. Aerosol exposure of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis*. J. Wild Dis. 39:817-823.
- Petran E. I. and H. D. Vera. 1971. Media for selective isolation of mycobacteria. Heath and Laboratory Science 8; 225-230.
- Pritchard D. G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. Journal of Comparative Pathology. 99:357-399.
- Ragg J. R., C. G. Mackintosh and H. Moller. 2000. The scavenging behaviour of ferrets (*Mustela furo*), feral cats (*Felis domesticus*), possums (*Trichosurus vulpecula*), hedgehogs (*Erinaseus europaeus*) and harrier hawks (*Circus approximans*) on pastoral farmland in New Zeland: implications for bovine tuberculosis transmission. Z N Vet. J. 48:166-175.
- Rhoades E., F.F. Hso, J. B. Torelles, J. Turk, D. Chaterjee and D. G. Russell. 2003. Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. Mol. Microbiol. 48(4): 875-888.
- Ritacco V., B. López, I. N. de Cantor, L. Barrera, F. Enrico and A. Nader. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Research in Veterinary Science 50(3): 365-367.

- Rothel J. S., S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox and P. R. Wood. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67(4): 134-137.
- Rook G. A., G. Seah and A. Ustianowski. 2001. *M. tuberculosis*: Immunology and vaccination. *Eur. Respir.J.* 17(3):537-557.
- Ryan T. J., B. M. Buddle and G. W. De Lisle. 2000. An evaluation of the Gamma Interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *J. Research in Veterinary Science.* 69:57-61.
- Shi L. Y. J. Jung, S. Tyagi, M. L. Genaro and R. J. North. 2003. Expression of Th1- mediated immunity in mouse lungs induces a *Micobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(1): 241-246.
- Stetter M. D., S. K. Mikota, A. F. Gutter, E. R. Monterroso, J. R. Dalovisio, C. Degraw and T. Farley. 1995. Epizootic of *Mycobacterium bovis* in a zoologic park. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207:1618-1621.
- Sturgill-Koszycki S., P.H. Shlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-681.
- Schlugher, N. W. and W. N. Rom. 1998. The host immune response to tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 157:679-671.
- Tammemagi L., G. C. Simons, R. Kelman and W. T. K. Hall. 1973. A study of tuberculosis-like lesions in cattle slaughtered in Queensland meatworks. *Australian Veterinary Journal* 49:507-511.

- Tan S. L. and P. J. Parker. 2003. Emerging and diverse roles of protein Kinase C in immune cell signaling. *Biochem J.* 376: 545-552.
- Tarara R., M. A. Suleman, R. Sapolsky, M. J. Wabomba and J.G. Else. 1985. Tuberculosis in wild olive baboons, *Papio cynocephalus Anubis*, in Kenya. *Journal of Wildlife Diseases.* 21: 137-140.
- Tessaro S. V., L. B. Forbes and C. Turcotte. 1990. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, Canada. *Canadian Veterinary Journal* 31: 174-180.
- Thoen C., P. LoBue and I. De Kantor. 2006. The important of *Micobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112: 339-345.
- Vicente J., R. J. Delahay, N. J. Walker, C. L. Cheesman. 2007. Social organization and movement influence the incidence of bovine tuberculosis in an undisturbed high-density badger *Meles meles* population. *J. anim ecol.* 76:348-360.
- Voorhout W. F., T. Veenendaal, Y. Kuroki, Y. Agasawara, L. M. Vangolde and H. J. Geuse. 1992. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in tipe II cells, clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J. Histochem Citochem.* 5:59-66.
- Waters W. R., B. J. Nonnecke, F. E. Rahner, M. V. Palmer, D. L. Whiple and R. L. Horst. 2003. Modulation of *Mycobacterium bovis*-specific responses of bovine periphera blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 8: 1204-1212.
- Waters W. R., M. V. Palmer, T. C. Thacker, J. P. Bannantine, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, R. Greenwald, J. Esfandiari, J. McNair, J. M. Pollock, P. Andersen and K. P. Lyashchenko. 2006. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clinical and Vaccine Immunology.* 13:648-654.

- Weatherby K. E. B. S. Swilling and W. P. Lafuse. 2003. Resistance of macrophages to *Micobacterium avium* is induced by alpha-2-adrenergic stimulation. *Infect Immun.* 71(1):22-29.
- Wernery U. J. Kinne, K. L. Jahans, H. M. Vordermeier, J. Esfandiari, R. Greenwald, B. Johnson, A. Ul-Haq, K. P. Lyashchenko. 2007. Tuberculosis outbreak in a dromedary racing herd and rapid serological detection of infected camels. *Veterinary Microbiology.* 122:108-115.
- Wilesmith J.W., T. W. A. Little, H. V. Thompson and C. Swan. 1982. bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in an area of Dorset. I. Tuberculosis in cattle. *J. Hyg. Camb.* 89:195-210.
- Wilson P., E. Weavers, B. West, M. Taylor, J. Kavanagh and P. Jones. 1984. *Mycobacterium bovis* infection in primates in Dublin zoo: Epidemiological aspects and implications for management. *Laboratory Animals.* 18:383-387.
- Wood P. R., L. A. Corner, J. S. Rothel, J. L. Ripper, T. Fifis, B. S. Mc Cormick, B. Francis, L. Meville, K. Small, K. de Witte, J. Tolson, T. J. Ryan, G. W. de Lisle, J. C. Cox and S. L. Jones. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 31 (1): 71-79.
- Wood P. R., L. A. Corner, J. S. Rothel, C. Baldock, S. L. Jones, D. V. Cousins, B. S. McCormick, B. R. Francis, J. Creeper and N. E. Tweddle. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 68 (9): 286-290.
- Wood P. R., J. S. Rothel, P. G. D. McWaters and S. L. Jones. 1990a. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 25:37-46.

- Wood P. R., L. A. Corner and P. Placket. 1990b. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma-interferon. *Research in Veterinary Science* 49 (1): 46-49.
- Woodford M. H. 1982. Tuberculosis in wildlife in the Ruwenzori National Park. Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 14:81-88.
- Wosniak T. M., A. A. Ryan, J. A. Triccas and W. J. Britton. 2006. Plasmid interleukin 23 (IL-23), but not plasmid IL-27, enhances the protective efficacy of a DNA vaccine against *Micobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 74(1):557-565.