

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Test de gamma interferón como prueba confirmatoria
para el diagnóstico de la tuberculosis bovina**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Salud Animal

AUTOR

Lorgio Raúl Soto Requena

Lima-Perú

2007

Dedicatoria

**A Dios y a mis padres, que desde el cielo
me siguen amado, protegiéndome
y guiando mis pasos.
A Aura, mi esposa y el amor de mi vida.
A Sissy y Ronnie, mis queridos hijos.
A Trifi, mi amigo, un gran padre.**

Agradecimiento

Mi eterno agradecimiento al Dr. Alfredo Delgado por su amistad y dirección de la presente tesis.

A la Dra. Hermelinda Rivera, por su invaluable ayuda durante la realización de la EIA

Al Dr. Néstor Falcón por su asesoramiento en el desarrollo de la tesis.

A mis colegas y amigos del Ejército del Perú, por su motivación para concluir el presente trabajo.

A los ganaderos, propietarios de los establos que en forma desinteresada me permitieron realizar la presente investigación.

INDICE

I.	Introducción	1
II.	Revisión bibliográfica	4
1.	Tuberculosis y <i>Mycobacterium bovis</i>	4
2.	Impacto económico de la tuberculosis bovina	9
3.	Epidemiología de la tuberculosis bovina.....	11
4.	Patogenia e Inmunopatología de la tuberculosis bovina	15
5.	Diagnóstico de la tuberculosis bovina	26
5.1	Diagnóstico clínico	26
5.2	Diagnóstico anatomohistopatológico	28
5.3	Aislamiento de <i>Mycobacterium bovis</i>	28
5.4	Prueba intradérmica con de tuberculina o Mantoux, PPD.....	32
5.5	Prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)	37
5.6	Prueba de reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	38
5.7	Prueba de gamma interferón (γ INF)	39
6.	Control y erradicación	42
III.	Material y Métodos	45
1.	Animales	45
2.	Prueba intradérmica única	45
3.	Prueba gamma interferón	46
4.	Análisis de datos	47
	Método estadístico	47
5.	Resultados	48
6.	Discusión	50
7.	Conclusión	58
8.	Bibliografía	59
	Anexos	66

RESUMEN

Para comparar las bondades de la prueba intradérmica única (PIU) y la prueba de gamma interferón (γ INF) en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, se evaluaron ambas pruebas en 155 animales de dos establos lecheros del área de Lima y Callao bajo el Programa de control y erradicación de tuberculosis bovina del Ministerio de Agricultura. Se halló que 51 (32.9%) animales resultaron positivos a la PIU y 32 (20.6%) a la prueba de γ INF; asimismo, se pudo determinar que 27 animales resultaron positivos a γ INF de los 51 animales positivos a PIU y 5 entre los 104 animales negativos de la PIU. Evaluados bajo la prueba estadística de Índice de Kappa y Chi-2 de Mc Nemar se observó que existe una concordancia moderada entre las pruebas diagnósticas y que no se pueden reemplazar mutuamente entre ellas. Las diferencias se deberían a la baja sensibilidad del PIU y a reacciones cruzadas ante agentes afines no patógenos para los bovinos, toda vez que las pruebas, con características de PIU, al avanzar los programas de control y aumentan los falso positivos.

Palabras clave: prueba intradérmica única, gamma interferón, tuberculosis, bovino.

ABSTRACT

To compare the benefits of the unique intradermical test (UIT) and interferon gamma test (γ INF) in the diagnostic of bovine tuberculosis, evaluated both tests in 155 animals from two milk farms in the area of Lima and Callao for the program under control and eradication of bovine tuberculosis of agriculture ministry. They found that 51 (32.9%) animals were positive to UIT and 32 (20.6%) to the γ INF test; in the same way, they could determine that 27 animals were positives to γ INF test of the 51 positive animals to UIT and 5 from 104 negative animals to UIT. Evaluated for Kappa and McNemar statistical test, they observed that a moderate agreement exists between the diagnostical tests and they could not be replace mutually between them. The differences would be because of the low sensibility of UIT and cross-reactions in front of similar no-pathogen agents for bovines, just when the tests, with characteristics of UIT, advance and the programs of control decrease the prevalence of the disease and increase the false positives.

Key words: unique intradermical test, interferon gamma, tuberculosis, bovine.

I. Introducción

La tuberculosis (TBC), es una de las enfermedades infecciosas mas difundidas y antigua que conoce el hombre, afecta por igual a seres humanos y animales al infectarse con bacterias del genero *Mycobacterium*, principalmente con las especies *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) y *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La enfermedad era conocida por las culturas antiguas; la literatura hindú de los años 2000 AC describe “la fiebre lenta consumidora de los elefantes”, en el antiguo Egipto se conocía “la tisis del ganado”; en América se han demostrado la presencia de bacilo de Koch en una momia de la época de los incas del año 900 DC. La tuberculosis es aún un problema de actualidad, en humanos se ha hecho mas evidente en los últimos 25 años con la aparición del VIH.

El objetivo del mundo actual es la erradicación de la tuberculosis bovina y humana, algunos países desarrollados lo están logrando, para ello siguen procedimientos rigurosos de diagnóstico, aislamiento, sacrificio de animales enfermos, desinfección, reposición de hato con animales libres de la enfermedad, declaración de áreas libres, pasteurización de la leche y derivados, control del faenamiento del ganado en los camales y estricta vigilancia epidemiológica.

El Perú, desde el año 1999 el Ministerio de Agricultura mediante el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) viene ejecutando el Programa

de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina (PCETB); ha establecido como método oficial para el diagnóstico de la enfermedad el uso de **la prueba de tuberculina**, que consiste en la inoculación intradérmica del derivado de proteína purificada (PPD) del *M. bovis*; ésta, por ser una prueba de diagnóstico de tipo indirecto, no garantiza afirmar en un 100% que un animal reactor positivo sea debido a una infección por *M. bovis*. Esta prueba biológica no tiene un comportamiento uniforme y se sabe que se producen reacciones cruzadas por sensibilizaciones originadas con otras micobacterias no específicas, usualmente no patógenas para los bovinos, como los de origen humano, aviar, incluso los de vida libre y a sensibilizaciones por otras bacterias formadoras de granulomas y en consecuencia gran número de los resultado obtenidos son animales falso positivos.

De acuerdo al SENASA-PCETB todo animal reactor al PPD debe ser sometidos a la prueba doble comparativa, y de resultar nuevamente positivo, debe ser sacrificado sin considerar la posibilidad de ser reactores falso positivos, afectando la economía de los ganaderos por no tener derecho a reposición ni indemnización de parte de programa respectivo. A la necropsia y pruebas de laboratorio no siempre es posible demostrar lesiones compatibles ni aislar el *Mycobacterium*; esta realidad ocasiona reclamos e inconformidad de los ganaderos, y pone en riesgo al PCETB. Por otro lado, el cultivo y aislamiento de la micobacteria es un proceso lento y difícil que dura de 6 á 8 semanas de acuerdo a los métodos convencionales y la tipificación por especie no resulta fácil, especialmente si se emplea métodos bioquímicos y las pruebas moleculares como el PCR no siempre está al alcance de quien lo necesita

En los últimos años se han desarrollado pruebas de mayor especificidad para demostrar las infecciones por *M. bovis*; destacando la prueba moleculares e inmunoenzimáticas (ELISA, PCR, γ INF).

Los países en los que se ha logrado erradicar la TBC bovina, como Alemania, Australia y otros, vienen usando en forma masiva la prueba de

Gamma Interferón (γ INF) en los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina. Esta prueba ha demostrado tener la capacidad de diagnosticar los animales infectados con *M. bovis*, por medio de la determinación de niveles de gamma interferón en una prueba in vitro con sangre entera. Esta prueba es rápida y fácil de realizar, utiliza anticuerpos monoclonales antigamma interferón, permite diferenciar las infecciones debidas a *M. bovis* y *Mycobacterium avium* (*M. avium*).

En el presente estudio, se plantea utilizar la prueba del gamma interferón en bovinos reactivos positivo y negativo a la clásica prueba de tuberculina en establos ubicados en la provincia de Lima que se hallan bajo el control SENASA-PCETB, el objetivo es comparar las bondades de la prueba en mención frente a la prueba de tuberculina, de tal modo que se pueda usar como prueba complementaria o confirmatoria en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en nuestro país.

II. Revisión Bibliográfica

1. La tuberculosis bovina y el *Mycobacterium bovis*

La tuberculosis bovina es una enfermedad de distribución mundial, producido por el bacilo del *M. bovis*, se presenta con mayor incidencia en los países en vías de desarrollo, en los que crea problemas de Salud Pública y de tipo económico, por la capacidad del agente causal de producir enfermedad en los humanos (zoonosis) y en los animales (Acha y Szyfres, 2003). Un tercio de la población mundial esta infectada con tuberculosis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que en el año 2004 surgieron 8.9 millones de nuevos casos de tuberculosis en el mundo y murieron 1.7 millones personas como consecuencia de esta enfermedad, 98% de los casos pertenecen a los países no industrializados, la incidencia de la TBC en América es de 27/100,000 habitantes (OPS., 2006). Sin embargo; en los últimos años los casos de tuberculosis humana debido a *M. bovis* son menos frecuentes que los casos debidos a *M. tuberculosis* (Acha y Szyfres, 2003), se estima que el 2% de la tuberculosis pulmonar y el 8% de la tuberculosis extra pulmonar humana en Latino América son debidas a *M. bovis* y cada año se presenta 7000 nuevos casos de TBC humana debido a este bacilo (Torres, 2006).

La enfermedad en los bovinos se caracteriza por su larga duración y sus efectos repercuten en la capacidad productiva de los animales. Se estima que

los bovinos infectados pierden de 10 á 25 % de su capacidad productiva (Blood y Henderson, 1976), disminuyen su fertilidad hasta en un 6%; las vacas en ordeño disminuyen la producción total de leche en un 10%, la duración del periodo de lactancias se reduce a la mitad, los animales pierden en promedio el 15% del peso normal, se afecta la inmunidad de los animales infectados y aumenta la susceptibilidad a la presentación de otras enfermedades, hay pérdidas de terneros en hembras tuberculosas y decomiso de las carcasas de animales afectados en los camales o centros de faenamiento; además, comercialmente en el mercado mundial los productos agropecuarios de los países con tuberculosis bovina son castigados arancelariamente o simplemente no son aceptados. (Osorio, 2001).

De otra parte, al presentarse la enfermedad en los seres humanos, las pérdidas económicas se ven incrementadas por la incapacidad laboral de los pacientes tuberculosos (horas hombre) y gastos por tratamientos prolongados (Acha y Szyfres, 2003; Delgado, 1998).

En el Perú, según el Ministerio de Agricultura (SENASA) la enfermedad está presente en la mayoría de los departamentos, la prevalencia fue de 0.22%, 0.378%, 0.244 %, 0.19%, para los años 1999, 2000, 2001 y 2002 respectivamente; en estos mismos años, a nivel nacional por departamentos la mayor prevalencia se observó en el Departamento de Lima y es mayor que el promedio nacional, alcanzando el: 0.46 %, 1.464 %, 0.34 % y 0.80 % para los años 1999, 2000, 2001 y 2002 respectivamente; en la Provincia de Lima el año 2002 se reportó una prevalencia de 1.25 % (Villavicencio, 2003, comunicación personal, Ministerio de Agricultura,2003).

El ganado bovino, es el reservorio natural del bacilo *M. bovis*; sin embargo, otras micobacterias como el *M. tuberculosis* (humano), el *M. avium* y micobacterias de vida libre, también pueden infectar a los bovinos sin producir enfermedad, simplemente sensibilizándolo. Existe una gran similitud genómica entre las micobacterias agrupado en el denominado complejo de *M.*

tuberculosis, integrado por el *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* (subtipos I y II), el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), y *M. microtis*, *M. pinnipedii* y *M. tuberculosis subs. caprae*; son especies altamente relacionadas que exhiben gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores. La secuencia genómica de *M. bovis* tiene más de un 99,95% de coincidencia con la de *M. tuberculosis* (Prat y col., 2002, Torres, 2006).

Los hatos o establos lecheros libres de tuberculosis generalmente se infectan con el *Mycobacterium* por deficiencias de manejo, como:

- a. Introducción de animales infectados, aparentemente sanos, de origen desconocido.
- b. Contacto de animales sanos con animales infectados en ferias, exposiciones, remates u otros eventos de concentración de animales.
- c. Ingreso al establo de otras especies animales infectadas.
- d. Contacto con personas enfermas de tuberculosis.

(Delgado, 1998; Osorio, 2001)

Las vías de infección son:

- a. Vía respiratoria: es la principal vía de contagio, 80 a 90% de los casos se transmiten por vía aerógena. El bovino enfermo al mugir puede eliminar microgotas con 100 á 200 bacilos por mugido; por otro lado, a través del estornudo y la tos pueden eliminar microgotas con 1 ó 2 bacilos.
- b. Vía digestiva: se estima que de 10 a 20% de los casos se contagian por esta vía. Esta forma de transmisión se presenta en terneros que se alimentan con leche de vacas tuberculosas o por la ingestión de leche infectada no pasteurizada. De 1 a 3% de las vacas infectadas desarrollan mastitis tuberculosa, convirtiéndose en diseminadoras permanentes de bacilos por la leche. También

puede ocurrir infecciones por esta vía debido al consumo de alimentos y agua contaminada por contacto con el suelo, heces u orina de animales infectados con el bacilo.

- c. Vía congénita: ésta vía de contaminación es probable en el caso de crías de vacas tuberculosas.
- d. Vía genital: los toros se infectan sirviendo vacas con metritis tuberculosa, cerca de 5% de las vacas infectadas presentan metritis tuberculosa. La transmisión más importante se produce por medio de la inseminación artificial, al utilizar semen de toros infectados.
- e. Vía cutánea: por introducción del bacilo en lesiones de la piel al entrar en contacto con material infectado (Delgado, A. 1998; Osorio, 2001)

El hombre por su relación con los bovinos está expuesto a contaminarse con el *M. bovis*; en el pasado esta bacteria ha sido responsable de muchas muertes infantiles, en razón que la leche de vacunos constituía la dieta de muchos pueblos y era el vehículo de transmisión del *Mycobacterium*. En las primeras décadas del siglo XX el bacilo tuberculoso bovino fue declarado como el responsable del 10 al 30% de las linfadenitis tuberculosas y del 5% de la tuberculosis pulmonar, para 1960 la proporción de los casos decreció a menos de 1-2% en la mayoría de los países. La transmisión por vía digestiva era por la ingestión de productos lácteos no pasteurizados o hervidos insuficientemente (Acha y Szyfres, 2003).

En la actualidad el mayor riesgo de infección se da en personas expuestas a la contaminación con agentes tuberculosos, llegando a considerarse como una enfermedad de tipo ocupacional, los mas expuestos son los veterinarios, zootecnistas, técnicos pecuarios, estudiantes rurales, propietarios, campesinos, operarios de mataderos, frigoríficos y establos, entre otros (Acha y Szyfres, 2003; Osorio, 2002; Delgado, 1998; Rieder, 1999).

La tuberculosis es una enfermedad insidiosa que afecta a diversas especies animales, salvajes y domésticos (Dirksen y col., 2005), por ejemplo los porcinos son susceptibles a la infección por *M. avium*, *M. tuberculosis* y *M. bovis*, siendo este último el de mayor importancia económica, ya que causa en ellos lesiones más extensas y generalizadas que las otras dos. La infección por *M. bovis* en el cerdo es secundaria a la infección en el ganado bovino y proviene generalmente de la alimentación con subproductos lácteos de ganado infectado. En otros casos los porcinos son infectados por el *M. tuberculosis* al comer residuos de restaurantes u hospitales no tratados. Los cerdos pueden adquirir la infección por *M. avium* por contacto con heces infectadas o por consumir aves enfermas (Blood y Henderson, 1976).

La tuberculosis aviar se encuentra en aves criadas para consumo familiar que se mantienen vivas por mucho tiempo en los establecimientos de campo. Las aves son susceptibles al *M. avium* y la vía de infección es la digestiva, pero en nuestro medio no se registran aislamiento alguno y en pruebas de campo se han encontrado lesiones en aves, pero ellos correspondían a *M. bovis* (Delgado, 2007. comunicación personal). Otros mamíferos como los camélidos sudamericanos (llamas, alpacas), carnívoros domésticos (perros y gatos), elefantes y rinocerontes, también son susceptibles de contraer la tuberculosis (Castagnino y col 1968; Hesketh y col., 1994; Morar, 2003)

En muchos países se considera a los animales silvestres como reservorios y agentes transmisores de la tuberculosis, en el Reino Unido los tejones; Nueva Zelanda los marsupiales, Estados Unidos el venado de cola blanca, Canadá los bisontes, etc. (Dirksen y col., 2005; Morar, 2003).

La técnica de diagnóstico mundialmente utilizada en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina es la prueba intradérmica (PIU), ésta tiene el gran inconveniente de tener baja sensibilidad y relativa alta especificada por lo que lleva a la presencia de animales falso negativos y falso

positivos durante las pruebas diagnósticas. Se conoce que una prueba diagnóstica con las características de la PIU es aceptable al comienzo de la campaña de control y erradicación; porque, conforme avanza el programa la prevalencia de la enfermedad disminuye, los animales falso positivos se incrementan y la proporción de animales sanos que se sacrifican son mayores. Por lo tanto, el nivel aceptable de la prueba depende de la fase control y erradicación, por lo que cerca del final de la campaña de erradicación sería necesario una técnica mas sensible y específica (Thrusfield, 1990).

2. Impacto económico de tuberculosis bovina.

La enfermedad del ganado vacuno ocasionado por *M. bovis*, produce grandes pérdidas económicas directas e indirectas a las ganaderías y países, por lo que la actual política de los gobiernos está dirigida al control y erradicación de la enfermedad.

En el Perú, la situación de la tuberculosis bovina es similar a la observada en otros países latinoamericanos (Colombia, Venezuela, Brasil, Uruguay, Chile, Argentina, etc); tiene importancia por los problemas del punto de vista de la producción y sanidad animal, y Salud Pública. En nuestro país se desconoce el real impacto económico de la enfermedad.

Colombia estima que tiene una pérdida económica ocasionada por la tuberculosis bovina de aproximadamente 12,000 millones de pesos al año (6,000 millones de dólares USA); ante esta realidad, ha implementado una vigilancia activa, con responsabilidad compartida entre el Instituto Colombiano para la Agricultura (ICA) y los servicios de salud; consideran que la inspección *post mortem* en los camales constituye una actividad efectiva e importante con la que cuentan para la vigilancia de la tuberculosis bovina (Osorio, 2001).

En Argentina; la tuberculosis bovina es una enfermedad endémica, en la provincia de Santa Fé de un total de 288,000 bovinos faenados el decomiso por lesiones tuberculosas alcanzó el 5.6 %; otro estudio de vigilancia epidemiológica en el Departamento Castellanos indicó que el 7.7 % de 2224 las vacas lecheras faenadas en frigoríficos tuvo lesiones compatibles con la tuberculosis bovina (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). En el año 2000 en el Departamento de San Justo – Córdoba sobre un ingreso a faena de 3,695 bovinos se detectaron lesiones compatibles con tuberculosis bovina (TBB) en 3.4 % de los animales, destacándose un mayor número de decomisos en vacas que en novillos (Abdala, y Tarabla, 2003). De la información suministrada por el área estadística de la Dirección de Contralor del Servicio Nacional Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), sobre un promedio de faena anual de 10.000.000 de bovinos, las tasas de prevalencia de TBB detectada en 1969-2005 fluctuó entre 6.7 y 1.2% respectivamente (Torres, 2006)

De acuerdo con el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA-Argentina), el perjuicio ocasionado por esta enfermedad en el país sería de 63 millones de dólares por año; siendo las causas principales, la pérdida de peso del ganado, disminución de la producción láctea y producción de terneros; los decomisos en el matadero es el factor más importante de la significativa merma en los ingresos. Además, los animales infectados necesitan más tiempo para alcanzar el primer parto y tienen una vida útil más corta. La magnitud del problema sanitario se ve al hacer los cálculos del beneficio directo de la erradicación de la enfermedad, estiman que por el solo hecho de erradicar la enfermedad obtendrían 270 millones de litros de leche adicional por año (Rev.Chacra, Septiembre de 1999).

Las pérdidas económicas debidas a tuberculosis bovina se estiman los siguientes parámetros:

a.	Pérdidas por decomiso parcial o total por reses afectadas	9 %
b.	Pérdida en peso de los animales afectados, detectados	36 %
c.	Pérdidas en peso de los animales no detectados	18 %
d.	Pérdidas en la producción de terneros	12 %
e.	Pérdidas en la producción de leche	13 %
f.	Costos de las pruebas de tuberculina	6 %
g.	Tratamiento de casos humanos	1 %

(Delgado, 1998)

3. Epidemiología

En la dinámica de la tuberculosis bovina se distingue cuatro etapas bien definidas: **exposición, infección, enfermedad y muerte**. Para que un animal desarrolle tuberculosis, primero será necesario que este se exponga a otro animal infectado con el *M. bovis*, por lo que la presencia del bacilo es el factor principal; sin embargo, existen otros factores condicionantes que van a contribuir al desarrollo o no ocurrencia de la infección y la enfermedad, ellos son: la característica de la fuente de infección, el medio ambiente, la duración de la exposición y el estado del sistema inmunitario (González y col., 2002).

Para que un bovino se infecte, es requisito que el animal haya estado expuesto (**exposición**) a un caso potencialmente contagioso, por lo que una **exposición** significativa depende de la presencia y condición de casos contagiosos (animales o personas infectados) y de los factores modificadores que determinan la magnitud de la exposición, en particular la duración de contagiosidad, el número de interacciones entre los animales susceptibles y los casos contagiosos por unidad de tiempo. En la tuberculosis bovina (TBB) estos factores pueden variar en forma importante según el tipo de explotación, estación, densidad de la población, condiciones climáticas, entre otros. Definitivamente sin la presencia de casos contagiosos no hay exposición y en

el caso de existir, los factores de riesgo pueden ser modificados (Rieder, 1999, Diaz y col., 2002).

La duración de la contagiosidad es importante, los riesgos aumentan si la contagiosidad es prolongada. Un caso de tuberculosis no diagnosticado (falso negativo) permanecerá contagioso por un periodo mas largo que un caso diagnosticado; el número y naturaleza de las posibles interacciones varía con el tipo de explotación, en una ganadería de característica extensiva los riesgos de exposición serán menores que en una explotación de tipo intensivo. Otro factor a considerar es la densidad de la población, la probabilidad de que un animal susceptible esté expuesto a otro tuberculoso aumenta con la densidad de la población; así, en una población grande es probable que existan varios animales enfermos y si esto se da en una explotación de tipo intensiva, es mayor la probabilidad que animales susceptible se ponga en contacto (se exponga) con un animal enfermo (González y col., 2002; Díaz y col., 2002; Farga,1982).

Las condiciones climáticas es otro factor importante en la transmisión de la tuberculosis, los bacilos tuberculosos eliminados en espacios exteriores se diseminan rápidamente y expuestos a los rayos solares mueren en poco tiempo debido al efecto de los rayos ultravioletas; por el contrario, los bacilos eliminados en espacios cerrados pueden mantenerse vivos por varios meses y constituir potenciales fuentes de infección por periodos prolongados. La ventilación, la humedad, influyen en el mantenimiento de la concentración, supervivencia y tiempo de permanencia de las microgotas contagiosas en el aire. En el aire saturado de humedad toda las gotitas de aerosoles caen al suelo en menos de 10 segundos desde una altura de dos metros, excepto las más pequeñas; el tiempo de permanencia en el aire de las gotitas de mayor dimensión es demasiado corto para que puedan ser inhalados por un animal. (González y col., 2002; Aranaz y col., 1996).

La infección tuberculosa ocurre esencialmente por vía aérea; la vía digestiva por medio del consumo de la leche y alimentos contaminados y otras vías de infección son medios de transmisión importante, pero su contribución en la morbilidad de la tuberculosis en la actualidad es baja. Para que el agente infeccioso sea transmisible por vía aérea es requisito que las microgotas conteniendo en su núcleo el *Mycobacterium* permanezca suspendido en el aire, para ello es necesario que estas tengan un tamaño apropiado que les permita permanecer en suspensión (pueden permanecer varias horas en aire) y llegar a los alvéolos pulmonares; las partículas grandes caen más rápidamente al suelo, y si son inhalados son atrapados por el sistema mucociliar del árbol traqueobronquial, barridos y luego tragados, con la cual se hacen menos inofensivas. Para una infección por vía respiratoria se requieren unas cuantas micobacterias, mientras que para una infección digestiva se requiere de millones (González y col., 2002).

Sonkin, observó que la mayoría de las partículas de más de 5 micrómetros de diámetros son atrapados en la nariz, mientras que las inferiores a 0.1 micrómetros tienden a permanecer suspendidos y son capaces de llegar a los alvéolos; este estudio y otros han demostrado que la posibilidad de retención de las microgotas u otras partículas en el tracto respiratorio disminuye con el tamaño, a mayor tamaño mayor posibilidad de retención. La cantidad de bacilos en el aire está determinado por el número de bacilos expulsados por una especie tuberculosa, el cual a su vez determina el número de infecciones que es capaz de producir. Así; para una especie susceptible, el riesgo de ser infectado depende de la densidad de los bacilos en el aire y de la duración (tiempo) de exposición a ese ambiente (González y col. 2002; Rieder y col., 1989).

La respuesta inmunitaria del hospedero es otro factor primordial en la ocurrencia de la infección tuberculosa (factor de naturaleza endógena); teóricamente, para que se produzca una infección tuberculosa es suficiente que un solo bacilo se adhiera a la pared alveolar, sin embargo esto no es

totalmente cierto, en realidad es imposible; porque, un bacilo que se adhiere a la pared alveolar se enfrenta a dos posibilidades: o logra establecer una infección tuberculosa o es eliminado antes de hacerlo.

Los bacilos después de ser fagocitados por los macrófagos alveolares son incorporados al fagosoma, donde pueden ser destruidos por una variedad de mecanismos, como: la fusión fagosoma – lisosoma, la generación de radicales libres y la generación de intermediarios nitrogenados activos (no ocurre con facilidad si los macrófagos no han sido activados). La función de los macrófagos en la infección tuberculosa puede variar de un individuo a otro y en el tiempo, lo que representa un factor modificador del riesgo asociado a la implantación de los bacilos y a su capacidad para establecer una infección tuberculosa (Delgado, 1998; Rojas, 1995).

Para la ocurrencia fehaciente de la **enfermedad tuberculosa**, es requisito que previamente haya ocurrido la infección del animal con el *Mycobacterium*. Sin embargo en la mayoría de los casos no se puede determinar el porqué un animal infectado (subclínico) con el *M. bovis* no desarrolla la enfermedad (clínico); de otra parte, existe una serie de factores que aumenta el riesgo de progresión de una infección subclínica a enfermedad. La asociación temporal (tiempo) entre la infección y la progresión de la enfermedad ha sido reconocida, desde hace mucho tiempo, esta asociación es muy clara para el desarrollo de la tuberculosis primaria.

El riesgo de desarrollar tuberculosis dentro un breve periodo de tiempo que sigue a la infección se ve influenciado por estado inmunitario del animal (**efecto filtro**), los animales o especies que tienen menos defensas para evitar la progresión de la infección subclínica a enfermedad son los que con mayor probabilidad desarrollarán la tuberculosis; por el contrario, el hecho de no desarrollar la enfermedad inmediatamente después de la infección puede indicar mejores mecanismos de defensa (Rieder, 1999).

El tiempo transcurrido desde el momento de la infección es probablemente uno de los mayores riesgos de la enfermedad tuberculosa. Este es un factor poderoso, puesto que una infección reciente tiene una probabilidad 10 veces mayor de producir tuberculosis que una infección antigua (Rieder , 1999).

De otra parte, la manifestación de enfermedades inmunodepresivas predispone a la pronta ocurrencia de la tuberculosis, como es el caso de la **diarrea viral bovina** o las infecciones con **virus del VIH en humanos**. Estudios en el hombre han demostrado que la infección con el virus VIH constituye el factor de mayor riesgo para la progresión de las infecciones preexistentes con *M. tuberculosis* a enfermedad tuberculosa. Investigaciones realizados en Florida en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida determinaron que la tuberculosis se presentó más de un mes antes que otras enfermedades ocasionadas por agentes oportunistas en un 50 % de los casos; también demostraron que el riesgo de tuberculosis en personas infectadas con VIH está estrechamente relacionada con el número de linfocitos CD4+, la tuberculosis diseminada aparece comúnmente en pacientes con recuento bajo de linfocitos CD4. Otros factores de riesgo son: la edad, factores genéticos, la nutrición, tratamiento con corticoides, gestación, virulencia de las cepas, reinfección (Rieder y col. 1989; Center of Disease Control, 1987; Antonucci, col., 1995).

4. Patogenia e inmunopatología de la tuberculosis bovina

Al prosperar la infección de *M bovis*, la bacteria se disemina dentro del organismo en dos etapas denominadas:

- Tuberculosis primaria (Período del complejo primario)
- Tuberculosis secundaria (Período de diseminación post - primaria)

En la **tuberculosis primaria o periodo del complejo primario**, la lesión se inicia en el órgano que actúa como puerta de entrada, en este lugar se establece el primer contacto fértil entre el *Mycobacterium* y el organismo, el cual se conoce como **foco primario**, en este punto de anidamiento del bacilo se desencadenan una serie de reacciones histológicas locales y una reacción general orgánica. Posteriormente o en algunos casos simultáneamente los bacilos drenan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales, produciéndose una adenopatía, originando una lesión similar a la del foco primario, generalmente son vehiculizados por los macrófagos. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el nódulo linfático regional constituye el **complejo primario**. Al producirse el complejo primario pulmonar, el bacilo penetra en los pulmones, se multiplica y se disemina en el mismo órgano, produciendo lesiones en forma de tubérculo que se traducen en signos clínicos, infectando al mismo tiempo los nódulos linfáticos bronquiales (Blood, D. C., Henderson, J. A. 1976; Jubb y col., 1992; Cotran y col., 1990; Nieberle y col., 1961).

En ciertos casos sólo se observa la lesión ganglionar, probablemente porque el paso del bacilo por el órgano de entrada haya sido leve y rápido que carece de expresión clínica e inclusive no deja lesión macroscópica, cuando esto ocurre se denomina **complejo primario incompleto** (Nieberle y col., 1961; Aranaz y col., 1996). La primoinfección tuberculosa es el primer contacto del bacilo con el organismo (infección) y se demuestra por la virada tuberculínica, donde las pruebas negativas se hacen positivas. La tuberculosis primaria es la evolución de esa infección a enfermedad, se hace evidente la sintomatología clínica.

En la **tuberculosis secundaria o periodo de diseminación post-primaria**, la infección se desarrolla a partir de la reactivación de una lesión antigua, al disminuir los mecanismos de defensa del animal (reinfección endógena) o por una nueva infección externa (reinfección exógena), también denominada tuberculosis extraprimaria. Los bacilos, dan origen a granulomas

en los órganos donde se detienen; la extensión o diseminación de las lesiones se puede realizar por vía linfática, sanguínea o por contacto seroso. En el caso de diseminación por vía sanguínea los focos de infección se producen sobre todo en los pulmones, riñones, hígado y bazo; pudiendo llegar a los huesos, articulaciones, peritoneo, meninges. La tuberculosis extrapulmonar es menos común que la pulmonar (Blood y Henderson, 1976; Jubb y col., 1992; Cotran y col., 1990).

Los bacilos al ser inhalados por el animal, en el tracto respiratorio son fagocitados por los macrófagos alveolares a nivel de las paredes de los alvéolos; éstos, bien pueden eliminar la infección o permitir la proliferación del *Mycobacterium* dentro de ellos; de darse el último caso, se puede formar un foco primario, el cual es provocado por la acción de las citoquinas y se caracteriza por una reacción de hipersensibilidad tipo IV, lesión que está constituido por macrófagos muertos y degenerados, rodeados por células epitelioides, granulocitos, linfocitos y posteriormente por células gigantes (Aranaz y col., 1996; González y col., 2002).

La primera reacción pulmonar ante la presencia bacilar en los alvéolos, es la aparición de un exudado inflamatorio inespecífico, de tipo neumónico, formado por grupo de alvéolos totalmente llenos de un exudado plasmático y sanguíneo, extravasado a causa de la alteración de la pared capilar, los elementos celulares por orden cronológico de aparición son: las células alveolares adultas, los leucocitos, y algunos hematíes; luego aparecen células macrofágicas mononucleares de diversas procedencias: monocitos, histiocitos locales, células alveolares jóvenes, células endoteliales vasculares, etc., en estos momentos, aparecen los linfocitos en el exudado y en las zonas vecinas. En esta etapa hay un predominio de los macrófagos, se constituye en una alveolitis macrofágica de tipo inespecífico desde el punto de vista histológico, pese a que se hallan los *Mycobacterium*. Este periodo se hace específico con la aparición de las células gigantes multinucleadas o de Langhans, en estos momentos el tamaño del foco oscila entre 1 y 2 cm de

extensión inflamatoria inespecífica de color blanco grisáceo (González y col., 2002).

La resistencia natural del animal destruye algunos bacilos, liberando ciertas sustancias que actúan como antígenos. Sin embargo algunos bacilos no pueden ser destruidos, estos bacilos son los que llegan a los nódulos vía vasos linfáticos produciendo un proceso inflamatorio inespecífico hasta que el nivel de hipersensibilidad sea lo suficientemente acentuado como para producir una necrosis caseosa (González y col., 2002). El foco necrótico, caseoso o purulento, puede calcificarse y la lesión puede aparecer rodeada de tejido de granulación y por una cápsula fibrosa, formando el clásico **granuloma tuberculoso**. En las formas de infección digestiva de la enfermedad, el foco primario puede encontrarse en la faringe o en los nódulos linfáticos mesentéricos, y con menor frecuencia, en las amígdalas o en el intestino (Manual de Merck de Veterinaria. 2000).

El complejo primario, rara vez se cura en los animales, casi siempre progresa lenta o rápidamente según la condición inmunológica del hospedero. La diseminación a través del torrente sanguíneo y de las vías linfáticas puede ser generalizada y causar muerte rápida en el animal, como en el caso de la tuberculosis miliar aguda. Las lesiones nodulares pueden aparecer en muchos órganos, incluyendo la pleura, peritoneo, hígado, riñón, huesos, glándulas mamarias, aparato reproductor y sistema nervioso. La mayoría de las veces la tuberculosis bovina tiene un curso crónico y limitado a un solo órgano: El pulmón (Manual de Merck de Veterinaria. 2000). Experimentalmente el foco primario visible se desarrolla en ocho días y la calcificación en un plazo de tres semanas (Liébana y col., 1996)

El *Mycobacterium* ingresa al macrófago por una vía diferente a la fagocitosis, generalmente hace uso de los receptores CR1 y CR3 del complemento, independiente de los receptores Fc, de esta manera evita la activación de los mecanismos de defensa de la célula (disparo de los estallidos

oxidativos antimicrobianos), como la activación del sistema de la adenilciclase, la que se encarga de la degradación del ATP, de manera que evita la unión del fagosoma con el lisosoma primario. De otra parte, la bacteria tiene la capacidad de evitar la modificación del pH de la vacuola o fagosoma impidiendo o retardando la fusión de este con los lisosomas secundarios, con lo que evade la fagocitosis (Rojas, 1995; Slouson y Cooper, 1990).

La infección tuberculosa de los bovinos es principalmente por vía aerógena. El bacilo luego de penetrar en el pulmón se encuentra con cuatro posibilidades o caminos a seguir:

- a. Si la respuesta inicial del sistema inmunológico del hospedero es muy efectiva, entonces los bacilos son destruidos completamente, el animal no tiene posibilidad de desarrollar tuberculosis.
- b. Si los bacilos se multiplican y crecen, se desarrolla la infección primaria (foco primario) que puede desencadenar en una tuberculosis primaria.
- c. Otra posibilidad es que los bacilos entren en un estado de latencia, “durmientes” y no causan enfermedad, se conoce como infección latente, la cual se evidencia por medio de una prueba de tuberculina positiva.
- d. Finalmente los bacilos en estado latente se activan y pueden comenzar a crecer y desarrollar una enfermedad clínica. (De la Parte-Perez y col., 2001; Rojas, 1995).

Las funciones bactericidas de los macrófagos no actúan si previamente no han sido activados o es muy débil durante el primer contacto con bacilo, esta activación es mediada por una poderosa citoquina, el gamma interferón (γ INF) que al contacto o impacto sobre el macrófago lo torna susceptible a responder a una segunda señal impartida por citoquinas como el factor de necrosis tumoral (FNT) o ciertos productos bacterianos como las glicoproteínas de la pared celular de la micobacteria (lipoarabinomanos (LAM)). Las células

fagocitarias tienen mayor capacidad defensiva ante un segundo ataque del germen (Rojas, 1995; Roitt y col., 1998).

La habilidad de la micobacteria para evadir la muerte o su destrucción que puede producirle los IRO o el nitrógeno, es una etapa crucial para el desarrollo de la infección latente. El *Mycobacterium* puede producir sustancias que inactivan las especies reactivas del nitrógeno o quizás elaboran sustancias que desregulan la transcripción de genes, como la sintetasa del óxido nítrico inducible para así evadir la defensa del hospedero (Delgado, 1998).

La invasión de los macrófagos estimula a los linfocitos T-CD4+ (linfocitos ayudadores), estos en respuesta producen gamma interferón (γ INF) y factor de necrosis tumoral (TNF); los macrófagos se activan e inician la producción de óxido nítrico con el que detienen el crecimiento y multiplicación de la bacteria. El *Micobacterium* se defiende estimulando a los linfocitos T-CD8 para que por medio de la interleuquinas (IL) 4 y 10 frene la producción de γ INF. (Rojas, 1995). Otro mecanismo de defensa importante del organismo es la formación de granulomas, con la cual se aísla a los macrófagos infectados (Roitt y col 1998; Tizard, 1995).

Si hay una inmunodepresión por cualquier factor de estrés u otro, el caseum se licua, creándose un medio altamente favorable para la multiplicación de la micobacteria, lo cual permite que éstos se escapen del granuloma y se difunde la infección a zonas aledañas; por vía hematógena, la infección se disemina a otros órganos diferentes al pulmón (Blood y Henderson, 1976).

El esquema clásico de la tuberculosis se encuadra de alguna manera en el siguiente proceso:

- a. El bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares.
- b. Luego es transportado a los nódulos linfáticos donde se encuentra con los linfocitos T, CD4+.

- c. Los macrófagos infectados presentan a los LT, CD4+ alguno de los varios antígenos del *Mycobacterium*.
- d. Liberación de linfoquinas.
- e. Activación de los macrófagos alveolares.
- f. Destrucción de los bacilos intracelulares.

Los linfocitos T CD4+ poseen numerosos receptores en su membrana, alguno de los cuales pueden reconocer y corresponder con la configuración molecular de algún antígeno del *Mycobacterium*. Cuando esto ocurre y ambas células comparten los antígenos del CMH, el linfocito es estimulado, liberando entre otros mediadores la IL2, que determina la proliferación de este clon de linfocitos ag-específicos. Por otra parte, los macrófagos liberan IL1, el cual es uno de los mediadores que activa a los linfocitos, haciéndolos expresar receptores para la IL2, luego se produce una transformación blástica a base de una explosiva multiplicación monoclonal de linfocitos T, capaces de reconocer al mismo antígeno. Los linfocitos activados son capaces de liberar una serie de sustancias de potente actividad biológica llamados linfoquinas o citoquinas; para el caso de la tuberculosis actúan sobre los mismos macrófagos alveolares.

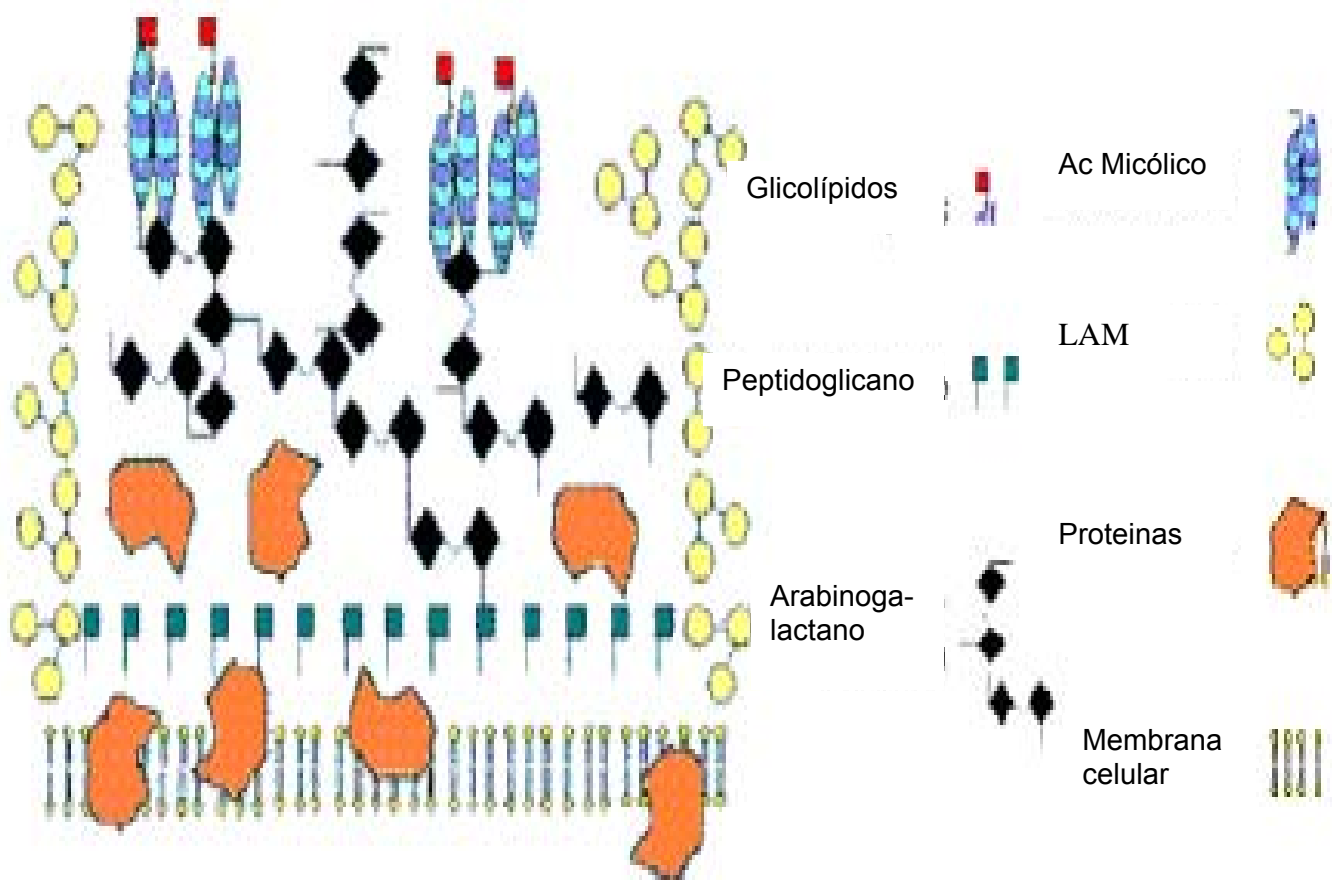
Los linfocitos activados atraen, activan y aglutinan los macrófagos, haciéndolos experimentar una explosión metabólica que los transforma en agentes formidables contra el *Mycobacterium*. Los macrófagos activados aumentan de tamaño y se llenan de grandes retículos endoplasmáticos, mitocondrias, lisosomas, vesículas y vacuolas con enzimas digestivas y oxidativas; en este momento la célula dispone de una potente maquinaria que le permite sintetizar una serie de enzimas proteolíticas y radicales tóxicos de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, el que ha sido sindicado como uno de los principales mecanismo destructores de las micobacterias intracelulares. Así, los macrófagos son por una parte inductores de la respuesta inmune, actuando como las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T y al mismo tiempo serían los efectores de la inmunidad

retardada, al ser activados por las linfoquinas liberadas por estos mismos linfocitos ya estimulados (Farga, 1982).

La micobacteria tiene más de 1000 Ag diferentes, algunos inmunogénicos, otros inmunosupresores. Unos son presentados por el Ag CMH-II a los LT-CD4+ y otros por los CMH-I a los LT-CD8+ (Rojas, 1995).

Se han realizado muchos estudios a fin de conocer la composición química de la bacteria, particularmente la de su pared celular, con el objeto de conocer la patogenia de la enfermedad, perfeccionar las técnicas de diagnóstico y elaborar vacunas.

El *M. bovis* no produce endotoxinas, exotoxinas, ni enzimas histolíticas. La pared celular es rica en lípidos, por lo que su superficie es hidrófoba; ésta es la razón por lo que las micobacterias son resistentes a muchos desinfectantes y a tinciones comunes de laboratorio, como las de Gram y Guiemsa. Una vez teñidos, los bacilos también son refractarios a la decoloración con soluciones ácidas, de donde proviene el nombre de bacilos acidorresistentes. Sus paredes son muy complejas, con alto contenido de lípidos, ceras y fosfátidos, entre las cuales se incluye los ácidos micólicos (ácidos $\alpha\alpha$ grasos de cadena larga con 60 a 90 carbonos). En la célula, los lípidos están unidos en su mayor parte a proteínas y polisacáridos, con un hidroxilo en el carbono β una cadena alifática ligada al carbono α , con las cuales forma una pared celular compleja, con un esqueleto de péptidoglicano y moléculas de arabinogalactanomicolato unidos por enlaces covalentes y cubiertas por lípidos libres y polipéptidos (Jubb y col., 1992; Jawest y col., 1996; Blood y Radostits, 1992; Delgado, 1998; De la Parte-Pérez y col., 2001).



Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentra en asociación con PG y entre la membrana, los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas. (Rev. Inst. Nac. Inf. Resp. Mex. Abr-May 2005)

Aproximadamente 25% del peso seco de la bacteria esta constituido por lípidos libres que pertenecen a las partes exteriores de la célula. Estos lípidos contienen ceras y micósidos específicos de cada especie (glucolípidos complejos y péptido-glucolípidos) y el factor de “cordón” (6,6”dimicolato de trehalosa); las cadenas peptídicas de la capa externa constituye el 15% del peso de la pared celular, dentro de ellos los péptidoglicanos son los elementos fundamental de la pared, estos se encuentran unidos a través de puentes intrapeptídicos de cadenas de peptidoglicanos, confiriéndole rigidez a la estructura del esqueleto. Los ácidos micólicos están unidos a estas cadenas por enlaces covalentes con la D-arabinosa y D-galactosa (De la Parte-Perez y col., 2001).

Se ha identificado una serie de Ag del bacilo, al parecer no desempeñan ningún papel en la virulencia del microorganismo; más importante parece ser el contenido de micósidos. Uno de estos micósidos extraídos con éter de petróleo a partir de bacilos virulentos, es el denominado “factor cordonal”, ha demostrado ser elemento esencial para el crecimiento *in vitro* del *M. bovis* siguiendo un patrón de cordones en forma de serpiente. Las bacterias que crecen de esta forma son virulentos para los animales, en cambio cuando se extrae el factor cordonal de los residuos tuberculosos, las bacterias pierden su virulencia. Este factor cordonal inhibe la migración de leucocitos, causa granulomas crónicos y puede actuar como un coadyuvante inmunitario (Gyles y Thoen, 1986; Jawest y col., 1996; Delgado, 1998).

Las cepas formadoras de cordones también poseen un glucolípido surfactado (sulfátido) que impide la fusión de los fagosomas con los lisosomas, lo cual favorece la supervivencia intracelular de las micobacterias en el interior de los macrófagos. Cuando algunos constituyentes de la pared de las micobacterias como la cera D (glucolípido) y el muramil dipéptido (un pequeño componente hidrosoluble) se inyectan junto con una tuberculoproteína, producen una intensa reacción de hipersensibilidad frente a la tuberculina y por tanto actúan como coadyuvantes. De esta forma, las fracciones lipídicas contribuyen tanto a la virulencia como al estado de hipersensibilidad asociado a tuberculosis (Gyles y Thoen, 1986; Jubb y col., 1992; Jawest y col., 1996; Blood y Radostits, 1992; Delgado, 1998).

Las micobacterias contienen varias proteínas que reaccionan frente a la tuberculina. Las proteínas unidas a una fracción cética pueden mediante inyección inducir una respuesta inmune celular (sensibilidad a la tuberculina) y provocar la formación de diversos anticuerpos. Los preparados extraídos y parcialmente purificados de estos derivados proteicos se utilizan como reactivos para las pruebas cutáneas (De la Parte-Pérez y col., 2001). Las micobacterias, también contienen diversos polisacáridos; desconociéndose su

función en la patogenia de la enfermedad, puede inducir hipersensibilidad del tipo inmediato y servir como antígeno en reacciones de personas infectadas (Gyles y Thoen, 1986; Jubb y col., 1992; Jawest y col., 1996; Blood y Radostits, 1992; Delgado, 1998).

En resumen los productos relacionados con la virulencia del *Mycobacterium*, son los complejos componentes de la pared celular, en la que destacan los siguientes componentes:

- a. Factor de cordón: es producido por miembros de los géneros bacterianos *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. El micósido más importante producido por las micobacterias, se llama “factor de cordón” porque hace que el microorganismo se desarrolle en forma de agregados laterales semejantes a cordones o cuerdas. El factor de cordón consta de trehalosa 6-6'-dimicolato, la trehalosa es una glucosa-a-1-1'-d-glucósido. Se ha demostrado que las micobacterias que carecen del factor de cordón no son patógenas. Se sospecha que este factor inhibe la fusión de los lisosomas con los fagosomas de los macrófagos, fenómeno que se considera clave para la supervivencia de *M. bovis* dentro de los macrófagos.
- b. Sulfátidos: son derivados aniónicos de sulfato de trehalosa que contienen ácidos grasos de cadena larga, ubicados en la superficie más externa de las micobacterias. Estudios acerca del sulfátido SL-1 más abundante en micobacterias demostraron que éste bloquea o invierte la imprimación de los monocitos por lipopolisacáridos o interferón gamma, dando lugar a que los monocitos produzcan pocos radicales superóxido y así el *Mycobacterium* fagocitado es protegido de morir dentro de la célula. Los monocitos expuestos al SL-1 tienen actividad limitada de cinasa de proteína C, pero producen altas cantidades de interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a).

- c. Arabinogalactano y lipoarabinomanano: producen una fuerte respuesta de anticuerpos, pero ineficaz. El lipoarabinomanano junto con el factor de cordón permiten producir granulomas tuberculosos y necrosis de los tejidos.
- d. Tuberculoproteínas: son capaces de generar la hipersensibilidad de tipo retardado y es utilizada para el diagnóstico de infección por *Mycobacterium*. (De la Parte-Pérez M y col., 2001)

5. Diagnóstico de la tuberculosis bovina

5.1. Diagnóstico clínico

Esta enfermedad habitualmente es de tipo crónico y debilitante, en algunos casos puede adoptar un curso agudo, de progresión rápida. Los signos generales consisten en emaciación progresiva, letargia, debilidad, anorexia y fiebre fluctuante de poca intensidad.

En la forma respiratoria de la enfermedad, la participación pulmonar se caracteriza por tos crónica debida a bronconeumonía, la cual es débil intermitente y húmeda, con signos posteriores de disnea y taquípnea. Se estimula fácilmente por presión sobre la faringe o por el ejercicio y es más frecuente en la mañana o en tiempo frío. Los animales afectados tienden a ser más dóciles y perezosos, pero los ojos permanecen brillantes y vivos. En casos avanzados cuando gran parte del pulmón ha sido destruido es evidente los signos de disnea, con aumento de la frecuencia y profundidad. Las lesiones degenerativas producidas por la bronconeumonía granulomatosa pueden ser detectadas mediante auscultación y percusión (Blood y Henderson, 1976).

El aumento de tamaño de los ganglios linfáticos superficiales puede ser considerado como un signo interesante en el diagnóstico, las hipertrofias de los ganglios retrofaríngeos da origen a disfagia y respiración ruidosa por

obstrucción de la faringe. Estas hipertrofias ganglionares pueden ser parte del complejo primario o depender de diseminación posprimaria. Con frecuencia se observa una tumefacción o inflamación crónica indolora de los ganglios clínicamente explorables como los supramamarios, precrurales, preescapulares y submaxilares (Blood y Henderson, 1976).

En el caso de contaminación de los órganos reproductores por continuidad de peritonitis tuberculosa, son frecuentes los casos de bursitis y salpingitis, con lesiones en la trompa en forma de pequeños abultamientos. Un signo de la metritis tuberculosa es posible comprobar por la dificultad de la concepción, o ésta puede ser seguida por abortos recidivantes en fases avanzadas de la gestación; en algunos casos, pueden terminar en partos de terneros vivos que en la mayor parte de los casos mueren pronto por tuberculosis generalizada (Blood y Henderson, 1976).

La mastitis tuberculosa tiene gran importancia por el peligro que representa para la Salud Pública y la diseminación de la enfermedad a los terneros, además de la dificultad de diferenciarla de otras formas de mastitis. Un rasgo característico es una induración manifiesta e hipertrófica que suele desarrollarse en principio en la parte superior de la ubre, sobre todo en los cuartos glandulares posteriores. La hipertrofia de los ganglios con fibrosis del cuarto glandular no indica en forma obligada tuberculosis, pero el agrandamiento sin induración de la ubre sugiere tuberculosis o linfomatosis. Otros signos dependerán en gran medida del sistema involucrado. Una característica de la enfermedad es que el animal empieza a perder peso; todo animal que presenta enflaquecimiento progresivo, tos crónica, que suele presentarse como uno o dos golpes, en forma apagada, húmeda, penosa, sin mucha fuerza y cada tanto expulsan con ella una secreción mucopurulenta, debe despertar siempre sospecha de padecimiento de tuberculosis. (Blood y Henderson, 1976, Manual Merck, 2000).

5.2. Diagnóstico anatomohistopatológico

Los hallazgos de las lesiones tuberculosas al examen post mortem, está en relación con el grado de afección del órgano u órganos donde se observan granulomas tuberculosos; las lesiones macroscópicas más importantes son las adenopatías, especialmente los mediastínicos y los bronquiales, luego figuran las lesiones del parénquima pulmonar que son de carácter nodular y de tamaño variado, algunos con núcleo purulento y otros con núcleo caseoso. En el pulmón, a veces histológicamente las lesiones muestran características granulomatosas, con componentes celulares de un núcleo purulento o caseoso, rodeado de células multinucleadas, y más a la periferia presencia de fibroblastos; al someterse estos a la coloración ácido resistente, los bacilos se muestran de color violáceo (Jubb y col., 1992).

Las lesiones histológicamente se diferencian de la respuesta inflamatoria aguda clásica, porque la población de células que la infiltra es mayoritariamente mononuclear (macrófagos y linfocitos), aunque en las etapas tempranas se observa acumulación transitoria de neutrófilos. La reacción a la tuberculina en un animal sensibilizado es una reacción inflamatoria inmunogénica específica mediada por células T (Tizard, 1995; Jubb y col., 1992).

5.3. Aislamiento del *Mycobacterium*.

El cultivo bacteriológico es el método más sensible y específico de los que se conocen en la actualidad para detectar la presencia de micobacterias en una muestra determinada. Los medios de cultivo primario de las micobacterias incluye un medio selectivo y otro no selectivo. Los medios selectivos contienen antibióticos para evitar el sobrecrecimiento de bacterias y hongos contaminantes. Hay tres formulaciones generales que se usan tanto en los medios selectivos como no selectivos. Estos medios son el agar semisintético

como el Middlebrook 7H10 y 7H11, los medios sólidos a base de huevo coagulado, como el de Löwenstein-Jensen y los medios de caldo como el Middlebrook 7H9 y 7H12 (Jawest, 1996; Montoto, 2001)

El cultivo en caldo es frecuentemente el método más sensible y proporciona resultados más rápidos. Una vez sembrada la muestra se lleva a la incubación a 37°C en CO₂ al 5 a 10% por un periodo de hasta 8 semanas. Si los cultivos son negativos a una tinción ácido resistente, o se sospechan de micobacterias de crecimiento lento, entonces los medios inoculados deben incubarse a una temperatura mas baja (24- 37°C) y ambos grupos incubarse durante 12 semanas. Las micobacterias aisladas deben identificarse como especies. Los métodos convencionales para la identificación de micobacterias consideran entre otros, la observación de la velocidad de crecimiento, morfología de colonia, pigmentación y perfiles bioquímicos. Los métodos convencionales requieren frecuentemente entre 6 a 8 semanas para su identificación, en cierta forma muestran un grado de dificultad (Jawetz y col., 1996).

Método tradicional: Utiliza medios de cultivo sólido a base de huevo como Lowestein – Jensen y Stonebrink. En las últimas décadas el cultivo combinado **Medio sólido + Medio líquido** es considerado como prueba “**estándar de oro**” para la detección de Micobacterias, siendo la microscopía y cultivo la herramienta bacteriológica indispensable para el diagnóstico de la enfermedad micobacteriana.

Las muestras son incubadas a 37°C durante 8 semanas, con observaciones diarias las primeras 48 horas, luego con observaciones semanales hasta completar el tiempo de cultivo. Si al cabo de las 8 semanas no se observa desarrollo en los tubos, las muestras son consideradas negativas.

Método semiautomatizado: Es un método radiométrico que utiliza medio de cultivo a base de caldo Middlebrook enriquecido, rico en ácido palmítico marcado con carbono 14 (C14), el cual es un isótopo radiactivo natural (sistema BACTEC).

El sistema BACTEC 460 TB es una técnica que mide cuantitativamente el CO₂ marcado con C14 producido por el metabolismo de las micobacterias que se hallan en la muestra. El sistema BACTEC aspira el CO₂ marcado presente en la atmósfera del frasco y determina un valor de radiactividad (Índice de crecimiento) que es directamente proporcional a la cantidad de crecimiento en el medio.

Se trata de un método semiautomatizado de alta sensibilidad y especificad, que en forma simple permite hacer el diagnóstico de TBC en menos de una semana en alrededor del 95% de los casos. En muestras de humanos positivos este método permite realizar una prueba de identificación: prueba del NAP (p-nitro-alfa-acetil-beta-hidroxi-propiofenona) compuesto que permite diferenciar entre *M. tuberculosis* de otras Micobacterias no *M. tuberculosis* (MOTT). Por último también por este sistema se realiza la prueba de sensibilidad a las 5 drogas de primera línea, Estreptomina, Etambutol, Rifampicina, Isoniacida y Pirazinamida.

Método automatizado: Utilizan medios de cultivo a base de caldo Middlebrook. Están constituidos por estufas de cultivo continuo, con sensores capaces de detectar el CO₂ producido por el metabolismo de las Micobacterias presentes en la muestra. Los métodos de lectura pueden ser colorimétricos o fluométricos. Normalmente están conectados a una computadora que detecta la señal positiva, realiza los registros y el análisis de la información.

Actualmente existen los sistemas: BACTEC 9000, BACTEC MGIT 960 y MB/BACT. Los resultados de cultivo obtenidos por estos métodos son comparables a los del sistema BACTEC 460, pero aún no han sido evaluados

suficientemente los métodos de identificación y las pruebas de sensibilidad se encuentran en estudio en centros especializados.

Las ventajas y desventajas de los métodos semiautomatizados y automatizados sobre el método convencional de cultivo son:

Ventajas:

- (a) Mayor celeridad en el diagnóstico: el tiempo de positividad depende de la carga bacilar que contenga la muestra independientemente del método que se aplique.
- (b) Disminuyen el tiempo de detección de un cultivo positivo:
 - (1) promedio de 25 días por método convencional
 - (2) promedio de 11,8 días en sistema BACTEC 460
 - (3) promedio de 12,6 días en sistema BACTEC MGIT 960
 - (4) promedio de 15,9 días en sistema MB/BACT
- (c) Acorta el tiempo requerido para los estudios de sensibilidad a las drogas de primera línea.
 - (1) 30 – 40 días por método convencional
 - (2) 7 – 12 días por método radiométrico
- (d) El método radiométrico permite diferenciar en 3 a 5 días si el cultivo positivo corresponde al Complejo *M. tuberculosis* o a otras micobacterias *no M. tuberculosis (MOTT)*
- (e) Incremento de la sensibilidad: como el medio líquido de cultivo es más rico, es posible aislar más casos por cultivo y sobre todo si se combina con un medio sólido a base de huevo.

Desventajas:

- (a) Mayor carga de trabajo.
- (b) En cuanto al sistema BACTEC 460:
 - (1) Su sistema de lecturas con agujas, requiere un estricto control de mantenimiento para evitar las contaminaciones cruzadas.

- (2) Acumulación de botellas con material radiactivo hasta su descarte.
 - (c) El medio de cultivo líquido más rico permite el desarrollo también de algunos contaminantes.
 - (d) Mayor costo en el cultivo
 - (e) Mayor riesgo de bioseguridad.
- (Montoto, M. 2001)

5.4. Prueba de Intradermoreacción con tuberculina o Mantoux, PPD.

Esta prueba sirve básicamente para detectar animales infectados, por tanto, no identifica sólo a los enfermos, sino a todos los que han sido sensibilizados por bacilos ácido resistentes, al haber entrado en contacto con ellos. Este método clásico es usado por más de 100 años en el diagnóstico de la tuberculosis bovina y ha sido aceptada universalmente, se usa en los programas de erradicación de la enfermedad; consiste en la inyección intradérmica de extracto de *M. bovis* o *M. avium*, y su ulterior detección de una inflamación en el punto de inyección, luego de transcurrido 48 -72 horas.

La prueba consiste en la aplicación intradérmica del PPD en el pliegue caudal o en la tabla del cuello; en nuestro país y en muchos otros, la prueba intradérmica única (PIU) se realiza en el pliegue caudal y la tabla del cuello se usa para realizar la prueba doble comparativa (PDC) llamado también prueba intradérmica comparativa. Esta última prueba se utiliza para realizar el diagnóstico diferencial entre animales infectados por *M. bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina por exposición a *M. avium*, y según algunos autores incluye a otras bacterias (Aranaz y col, 1996). En el Perú se considera como prueba final para las decisiones sanitarias.

En Inglaterra usan la PIU en la tabla del cuello y utilizan un calibrador para la lectura de las dimensiones de la piel, esto les permite obtener datos

más exactos al interpretar la reacción. La piel del cuello es mucho más sensible que el pliegue caudal y cualquier punto del cuerpo del animal, aunque de la prueba es relativamente más lenta por el tiempo invertido en medir cuidadosamente todas las reacciones (Organización Mundial de Sanidad Animal –OIE, 2000, 2004)

La reacción a la PIU es una respuesta inmunológica específica de hipersensibilidad tardía mediada por células (tipo IV), ocurre cuando el animal ha sido infectado con algún tipo de micobacteria. En los casos de reacción positiva, como consecuencia de la reacción celular en el lugar de la inyección hay acumulación de linfocitos T, macrófagos, secreción de citocinas y sustancias histaminosímiles, se produce dentro de un periodo de 24-72 horas post inyección y macroscópicamente se manifiesta con inflamación circunscrita, vasodilatación con permeabilidad vascular incrementada, rubor, sensibilidad a la presión, e induración tisular que en algunas circunstancias involucra los nódulos regionales. En casos de reacciones intensas puede haber necrosis en el foco de inyección (Dirksen y col., 2005; Roitt y col., 1998).

De acuerdo a normas y disposiciones del SENASA-PERU la prueba diagnóstica oficial es la PIU caudal; a los animales que reaccionan como positivos a esta prueba, después de 60 días se les realizará la prueba cervical simple como confirmatoria, en caso de que el Médico Veterinario que ejecuto la PIU caudal lo considere necesario. En casos excepcionales y si las circunstancias lo ameritan se realiza la prueba cervical doble comparativa como definitiva, para diferenciar si la respuesta se debe a una infección por *M bovis* o a infecciones por otros agentes (Min Agricultura, 2003).

Animales no infectados con *M. bovis* pueden ser positivos a la prueba de tuberculina (falsos positivos). Esta sensibilidad es no específica o heteroespecífica y es causada por infección con micobacterias que poseen uno o más antígenos (grupos antigénicos) comunes con aquellos encontrados en *M. bovis*. Tales especies de micobacterias son usualmente no patógenas en el

bovino y son sólo importantes porque llevan a confusión en la lectura de la PIU (Torres. 2006). La gran actividad antigénica cruzada existente entre las especies de micobacterias y otros géneros comunes afines, limitan la capacidad diagnóstica de la prueba, por esta razón es complementada con la prueba simultánea o doble comparativa (PDC). De acuerdo a los dispositivos del SENASA-PERU la PDC es realizada en aquellos animales reactores positivos a la PIU (Min Agr 2000) en razón que es más sensible y permite un menor margen de error (Delgado,1998).

La PDC consiste en la inyección de tuberculina bovina y tuberculina aviar en diferentes puntos de la tabla del cuello, y la subsiguiente evaluación de la respuesta, la distancia entre ambas inyecciones debe ser de aproximadamente 12 á 15 cm y la subsiguiente evaluación de la respuesta. En animales jóvenes, cuyo cuello talvez no ofrezcan un espacio suficiente como para cumplir este requisito, deberán administrarse de forma simétrica una inyección en cada lado de la tabla, en el centro del tercio medio del cuello (OIE, 2003, Radostits y col., 2002).

La prueba intradérmica única (PIU) es una prueba estándar. Tradicionalmente se ha venido utilizando un preparado en un medio sintético y concentrado por calor (Heat/concentrated synthetic médium, HCSM); en la actualidad, este preparado se ha sustituido por un derivado proteico purificado (PPD, Purified protein dirivate); comparativamente, este último es de mayor especificidad. Por otra parte, ha quedado demostrado que los PSDs bovinos preparados a partir de la cepa de producción AN5 de *M. bovis* son más específicos que los PPD humanos elaborados a partir de *M. tuberculosis* (OIE. 2004)

El derivado proteico purificado (PPD), se prepara cultivando a los microorganismos en un medio sintético, matándolos con vapor y filtrándolos. La PPD se precipita agregando al filtrado ácido tricloracético, que luego es lavado y por último resuspendiéndolo en un amortiguador, quedando listo para

su uso. Es probable que su principal antígeno sea una proteína de choque térmico (Monaghan y col., 1994).

La potencia de las tuberculinas es estimada por métodos biológicos, basados en su comparación con tuberculinas estándar. La potencia se expresa en UI. En varios países, en lo que concierne al ganado bovino, se considera aceptable una tuberculina bovina cuando su potencia estimada garantiza una dosis mínima por bovino de 2000 UI, \pm 25%. En el caso de sujetos con una sensibilidad alérgica reducida, será necesaria una dosis superior de tuberculina. Para la práctica de campañas de erradicación se recomienda dosis de hasta 5000 UI. El volumen de cada dosis inyectada no debe sobrepasar los 0.2 ml (OIE., 2004).

La tuberculinización es una prueba que no garantiza un 100% de **sensibilidad**, es decir no detecta todos los animales infectados y tampoco es 100% **específica**, por que no detecta a todos los animales sin infección real. Existen animales que son positivos a la prueba pero no están infectados o enfermos con el *M bovis*, es decir son los **falso positivos**; otros son negativos a la prueba estando infectados o enfermos, son los **falsos negativos**. La limitación de la PIU es la existencia de fallas en la especificidad (presencia de animales falsos negativos), esto origina que un cierto número de animales infectados o enfermos quedan en el rebaño sin ser detectados. Esta situación es un gravísimo inconveniente para la erradicación de la tuberculosis bovina, pues los animales enfermos no identificados por la prueba se constituirán como fuentes de infección de los casos no infectados, este hecho se observa especialmente en los animales anérgicos como consecuencia de enfermedades inmunodepresivas, gestación, tuberculosis avanzada, tratamientos con corticoides, animales débiles, animales muy viejos o animales recientemente infectados, no responden a la PIU (Aranaz y col., 1996 y Delgado, 1998).

De acuerdo a normas y disposiciones del SENASA-PERU es obligatorio realizar de la PDC en aquellos animales reactivos positivos a la PIU, para confirmar que su respuesta se debe a una infección por *M. bovis* o a infecciones por otros agentes. La sensibilidad de la PDC es ligeramente mejor que la PIU; sin embargo, el hecho de no realizar la prueba en aquellos animales reactivos negativos a la PIU estaría permitiendo la posibilidad que animales falso negativos se queden sin identificar, constituyéndose en potenciales agentes contaminantes de los animales sanos. De otra parte la PDC sólo permite diferenciar infecciones producidas por *M. bovis* y *M. avium* no definiendo las infecciones debidas a otras micobacterias atípicas (*M. tuberculosis*, *M. africanum* (subtipos I y II), el bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG), y *M. microtis*, *M. pinnipedii* y *M. tuberculosis* Subs. *caprae*), por lo que los resultados no siempre son claros (Dirksen y col. 2005). Los casos sospechosos de TBB debe realizarse el diagnóstico diferencial con otras micobacterias afines, como también con infecciones por bacterias de otros géneros como los causantes de actinomicosis, actinobacilosis, nocardiosis, neumomicosis y otras que producen reacción cruzada o causan lesiones compatibles con tuberculosis (Dirksen y col. 2005).

Los valores de sensibilidad de la PIU oscila entre el 68-82% y la especificidad entre el 85-98.8%; para la PDC estos valores varían de 55.1 - 93.5% y 88.8-100% respectivamente. La especificidad de la prueba es generalmente alta, sin embargo muchas veces se presentan animales falso positivos que se atribuye a la sensibilización con micobacterias diferentes a *M. bovis* (Aranaz y col. 1996; Wood y Rothel 1994).

Al disminuir la prevalencia de la enfermedad, el porcentaje de animales con reacción positiva y sin lesiones macroscópicas o visibles aumenta. Esto sucede porque en exploraciones macroscópicas es poco visible para detectar la infección, y por la buena especificidad de la prueba de tuberculina (Radostits y col., 2002)

5.5. Prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)

Desde hace varios años se viene ensayando esta prueba como alternativa diagnóstica de la tuberculosis bovina, al parecer ofrece una mayor sensibilidad y rapidez. Los primeros trabajos que describen la prueba de ELISA, datan de la década del 70. Esta técnica utiliza la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa, mezclada con anti-inmunoglobulina como antígeno colocado en placas microtituladoras. La prueba de ELISA tiene una aplicación amplia para el diagnóstico serológico de una gama de enfermedades infecciosas, parasitarias, metabólicas, e incluso el cáncer (Engvall y Periman, 1972).

Nassau y col. (1976) fueron los primeros en usar la técnica de la prueba de ELISA en el diagnóstico de la tuberculosis y demostraron que eran altamente reproducibles. La aplicación de la prueba pasó desapercibido por varios años en el que sólo fue utilizado en trabajos experimentales. Después de muchos trabajos de investigación se ha llegado a la conclusión, que la prueba necesita una alta especificidad, para conseguir un alto valor de precisión; se estima que hoy en día se puede lograr una especificidad de aproximadamente 0.97 y este incremento se logrará empleando antígenos altamente purificados (Delgado, 1998; Benjamín y Daniel, 1982).

Thoen y col. en 1983 usaron ELISA simple y modificada para la detección de anticuerpos micobacteriales en sueros de vacas para el diagnóstico de infecciones de *M. bovis*. Reacciones positivas a ELISA modificada con carbobidina y cloruro de amonio, fueron encontradas en 77 de 80 vacas adultas que habían reaccionado a la intradermoreacción en pliegue caudal y la prueba comparativa cervical; 43 vacas mostraron lesiones de consideración al ser sacrificadas. Mas aún, la prueba de ELISA fue capaz de detectar reacciones positivas en 44 de 46 vacas que reaccionaron a la prueba intradérmica caudal, pero que resultaron negativas a la prueba comparativa

cervical, 20 de ellas presentaron lesiones de consideración al ser sacrificadas (Thoen y col., 1983).

A la fecha muchos trabajos se han realizado en diferentes países; en el Perú Delgado (1998), evaluó la prueba de ELISA, utilizando PPD como antígeno en el diagnóstico de tuberculosis bovina. Para la prueba utilizó 103 sueros de animales negativos y 53 PPD positivos. De los sueros controles positivos, la prueba de ELISA detectó 37 animales como positivos, que representa una sensibilidad de 69.81 ± 12.36 . De los sueros controles negativos la prueba detectó 74 sueros como negativos, que representa una especificidad del 71.84 ± 8.69 % (Delgado, 1998)

5.6. Prueba de reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Esta prueba es una gran alternativa para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, los resultados de las investigaciones demuestran que la prueba es altamente sensible (4 bacterias), específico y relativamente rápido (24 horas), permite detectar bacterias sin previo cultivo en lesiones de animales positivos a la PIU de la tuberculina. Los resultados arrojan que tiene una sensibilidad de un 93% en muestras de lesiones decomisado en mataderos. Por esta razón, algunos países vienen aplicando la prueba del PCR en forma rutinaria como apoyo a las investigaciones diagnósticas y epidemiológicas de la tuberculosis bovina, lo cual es necesario en un programa de vigilancia y erradicación. Actualmente el interés científico no sólo radica en mejorar los procedimientos rutinarios para la detección de la tuberculosis, si no en poder aplicarlas al animal in vivo, es decir en muestras de sangre y leche. (Romero y col., 2006; Zarraga, 2003).

La Universidad Austral de Chile viene haciendo estudios de genotipificación y validación de la prueba de PCR para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, de tal modo que se pueda aplicar esta técnica en

animales vivos, es decir en muestras de sangre y leche (Zarraga A.M., 2003). La gran desventaja de esta prueba estriba en el hecho de que es necesario encontrar bacilos, lo cual lleva a la conclusión de ser una prueba de alta sensibilidad en animales enfermos que eliminan micobacterias, mas no así en infectados que se encuentran en la fase de complejo primario, los que todavía no han hecho la diseminación pos primaria (Delgado, 2007, comunicación personal).

5.7. Prueba de Gamma Interferón (γ INF)

Las reacciones de hipersensibilidad retardada de la TBB también es posible medirse a través de una prueba *in vitro* denominada prueba de **gamma interferón**. Este es un método para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, que se caracteriza por su rapidez, sensibilidad y sencillez. Para la ejecución de esta prueba se requiere de anticuerpos monoclonales anti γ INF de *M. bovis* y anti γ INF de *M. avium* (Aranaz, 1996; Wood y col 1990).

En muchos países se viene realizando trabajos para determinar la efectividad de la prueba. El γ INF, es una linfoquina que tiene la capacidad de regular la respuesta inmunitaria, esta sustancia es producida por los linfocitos T sensibilizados bajo el estímulo de un antígeno, mitógenos o por la presencia de células malignas (Rojas, 1995). Se conoce que el γ INF, es un potente modulador de la respuesta celular en infecciones por *M. bovis*. Los linfocitos circulantes tienen la habilidad de producir γ INF en respuesta a los antígenos micobacteriales, como una respuesta inmune mediada por células que más tarde se establece. Los linfocitos T juegan un rol predominante en la respuesta inmune para la tuberculosis, la producción γ INF se ha demostrado en estudios *in vitro* de linfocitos sensibilizados. Wood y Rothel (1994) realizaron pruebas celulares in-vitro para el diagnóstico de tuberculosis bovina, basado en la detección de la producción de γ INF en cultivos de sangre entera, la prueba se basó en la estimulación de linfocitos con tuberculina PPD bovina y aviar. Los

linfocitos de los bovinos no infectados no produjeron γ INF, contrariamente los linfocitos infectados con *M. bovis* secretaron γ INF (Liébana y col., 1998).

Extensos estudios que se han realizado para comparar la sensibilidad y especificidad de la prueba de intradermorreacción y la prueba inmuno enzimática (EIA) para γ INF en bovinos, caprinos, búfalos, elefantes. En Australia con 13000 animales se ha obtenido con la prueba γ INF una sensibilidad de 77 á 94 %, mientras con la prueba intradérmica en la misma muestra obtuvieron sólo 65 % de sensibilidad (Wood y col., 1991). Resultados similares se determinaron en diferentes estudios, destacando las investigaciones realizadas en países como: Irlanda (Monaghan y col., 1995), España (Domingo y col., 1995), Nueva Zelanda (Rothel y col., 1992), México (Diaz y col., 2003), EEUU (Whipple y col., 1995), Italia (Dodo y col., 1996), etc.

En la actualidad la prueba de γ INF esta oficializada como prueba complementaria o confirmatoria en la mayoría de los países de la Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda, Gran Bretaña, Irlanda, en Norte América EEUU y México, Costa Rica, en América del Sur Argentina y también es aceptada por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE. 2004; Delgado, 2007, comunicación personal). La prueba del γ INF posee una serie de ventajas adicionales para el diagnóstico de tuberculosis bovina:

- a) Se manipulan los animales una sola vez.
- b) Se puede repetir la prueba tantas veces cuando sea necesaria .
- c) La prueba es comparativa y excluye aquellos animales que puedan reaccionar por infecciones con micobacterias atípicas no patógenas.
- d) El plasma obtenido del animal para el diagnóstico de tuberculosis bovina puede ser utilizado para el diagnóstico de otras enfermedades como Leptospirosis, Brucelosis, etc.

Los desventajas son: la prueba es relativamente cara y necesita un laboratorio para procesar las muestras.

En humanos se ha realizado una serie de estudios similares, para la determinación de infecciones por tuberculosis. Los investigadores de la Escuela de Medicina de John Hopkins han reportado sobre el empleo de la prueba de sangre en toxicómanos para detectar la tuberculosis, los resultados determinaron a través del nivel de γ INF que reacciona con las proteínas del *M. tuberculosis* (Converse y col., 1997).

Estos mismos investigadores descubrieron que el nivel de γ INF en la sangre se correlaciona del 89 al 100% de las veces con los resultados de la prueba de PPD administrado a la misma persona, a pesar de su estado de VIH. Asimismo, algunas personas que resultaron negativos a la prueba de PPD, manifestaron actividad del γ INF. Los investigadores creen que estas personas padecen de una infección anterior de tuberculosis y que sus resultados PPD negativos fueron falsos. Otro hecho que observaron fue que algunas personas VIH positivas con anergia PPD resultaron γ INF positivos, hecho que indica que también padecen de una infección anterior por tuberculosis (Converse y col. 1997).

Ritacco y col., evaluaron la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA sandwich para la detección de γ INF como prueba de diagnóstico de tuberculosis bovina, comparándola con la prueba de ELISA indirecta. Para el experimento utilizaron 39 bovinos PPD positivos y 52 bovinos controles, libres de la enfermedad. La prueba de ELISA sandwich para γ INF mostró una sensibilidad y especificidad 53.8% y 98.1% respectivamente; en comparación, la prueba de ELISA indirecta mostró una sensibilidad y especificidad de menor grado 35.9% y 92.3 % respectivamente (Ritacco y col., 1991).

Liébana y col. en 1998 utilizaron la prueba de γ INF y PIU para el diagnóstico de tuberculosis caprina, con la finalidad de obtener un grupo de animales libres de infección de un hato con alta prevalencia. Emplearon 87 cabras de la raza Guarrama, siguiendo un proceso de prueba simple y segregación de animales. Luego del estudio se determinó un mayor número de

animales infectados utilizando la prueba de γ INF en comparación a la prueba PIU; una conclusión, fue que la prueba puede ser utilizada con éxito en caprinos y que era factible detectar infecciones tempranas de *M. bovis* (Liébana y col., 1998); así mismo Neill y col. en 1994 aislaron *M. bovis* en 15 animales negativos a la PIU, pero positivos a la prueba de γ INF

6. Control y erradicación

La experiencia vivida y acumulada por distintos países indica que la tuberculosis bovina es controlable y erradicable; para lo cual es necesario seguir acciones sistemáticas orientadas a la detección, identificación y eliminación de animales positivos (Delgado, 1998).

Parte del éxito de los programas de control y erradicación de la enfermedad depende en gran medida del método que se utilice para diagnosticarla. Los métodos de diagnósticos tradicionales tales como la intradermorreacción a la tuberculina, presentan importantes limitaciones por su baja sensibilidad y especificidad, sumándose a ello las interferencias debida a reacciones cruzadas con otras micobacterias saprofitas y la poca o nula reacción de algunos animales en estado anérgico. Pese a que la sensibilidad se supera con el aislamiento microbiológico de la bacteria, persiste el inconveniente del prolongado tiempo de incubación (4-8 semanas) que requiere el cultivo para la obtención de colonias visibles.

La mayoría de los países con programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina, inclusive el Perú, han optado como método oficial para el diagnóstico de la enfermedad a la prueba intradérmica o de tuberculina. Pero como toda prueba diagnóstica indirecta no es 100% sensible, tampoco es 100% específica. Por lo tanto es relevante destacar que cuando se aplica una prueba en una población animal existe un porcentaje que, habiendo dado positivos a la prueba, en realidad no están enfermos (son los denominados

falso positivos). Igualmente hay una parte de los ejemplares que dieron negativos a la prueba, pero que en realidad son tuberculosos (conocidos como falso negativos). Además está demostrado, que a medida que avanza un plan de control y disminuye la prevalencia de la enfermedad, aumenta la cantidad de diagnósticos falso positivos. (Thrusfield,1995)

El éxito de los países que han logrado erradicar la enfermedad radica en que **adicionalmente** a las medidas de identificación, aislamiento y eliminación de los animales reactivos positivos han aplicado programas educativos y de incentivos económicos para los ganaderos con hatos libres de TBC, basado en compensaciones económicas e indemnizaciones por animal PPD positivo sacrificado y reposición de los hatos con animales libres de TBC. (Delgado, 2007, comunicación personal; Osorio 2001).

La carencia de un procedimiento que diagnostique rápida e inequívocamente la presencia del *M. bovis*, dificulta la erradicación y el control de la enfermedad en muchos países. Últimamente se han descubierto métodos más sensibles y específicos de diagnóstico de la tuberculosis de animales domésticos y salvajes. Estos métodos se basan en pruebas serológicas (ELISA) o análisis de muestras de sangre entera (γ INF) y se combinan con técnicas más rápidas de identificación de *M. bovis*, entre ellas el cultivo en medio líquido o la amplificación en cadena por la polimerasa (PCR). Gracias a estos métodos, el diagnóstico de la tuberculosis animal será más eficaz. Además, una serie de técnicas de análisis epidemiológico y de huellas genéticas ofrecen la posibilidad de optimizar las medidas de control que se apliquen (OIE., 2000).

La prueba del PCR, que consiste en la reacción de amplificación de secuencias génicas, se viene ensayando en muchos países del mundo con resultados cada vez más certeros. Su eficacia radica en la rápida identificación de los patógenos de difícil cultivo. Por ahora sólo se ha demostrado que la prueba puede ser realizada con muestras de tejidos, secreciones de animales

tuberculizados o decomisados en los mataderos, lo cual no ayuda en la detección de la infección en animales vivos condición fundamental para el control y erradicación (Delgado, 1998, Zarraga, 2003).

Por otra parte, desde hace años se viene ensayando la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) para la detección de animales positivos a tuberculosis bovina, los investigadores han visto que esta prueba ofrece una gran posibilidad para ser usado en serodiagnóstico de tuberculosis, por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez. Otra prueba que se vienen usando como alternativa diagnóstica, es la prueba del gamma interferón, consiste en medir la citoquina producida por los linfocitos en la lucha contra el *Mycobacterium*. Esta prueba trabaja con anticuerpos monoclonales para el γ INF.

III. Materiales y Métodos

1. Animales.

Se identificaron establos de la provincia de Lima y Callao que se encuentran dentro del Programa de Erradicación y Control de Tuberculosis Bovina del SENASA (Ministerio de Agricultura); fueron elegidos dos establos que tenían un manejo coherente desde todos los puntos de vista.

2. Prueba intradérmica única

El ganado de los establos elegidos fueron sometidos a la prueba intradérmica única en tabla de cuello, teniendo en cuenta que esta zona es mas sensible que el pliegue caudal. Siguiendo el método establecido por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), se rasuró el pelo del tercio medio de la tabla del cuello, luego se determinó el espesor de la piel de dicho punto, para en seguida colocar la inyección intradérmica de PPD bovino. La lectura de la reacción se realizó a las 72 horas de colocado la inyección, midiendo el espesor del pliegue cutáneo en cada punto de inoculación utilizando para el caso el calibrador cutáneo. La respuesta es considerada negativa, cuando el incremento del espesor de la piel es menor de 2 mm., por consiguiente es positiva cuando el aumento de engrosamiento del pliegue cutáneo es igual o mayor a 2 mm.; además se observa los signos clínicos característicos de edema localizado, calor y dolor.

3. Prueba de gamma interferón.

Se tomó muestras de 5 ml. de sangre entera a cada animal previamente identificado como reactor positivo y negativo a la prueba de tuberculina, utilizando heparina como anticoagulante. Siguiendo el protocolo establecido para la prueba por el productor del kit comercial (Bovine gamma interferon test, conocido como BOVIGAM™) las muestras de sangre fueron trasladadas al Laboratorio de Virología de la UNMSM FMV entre 3 a 5 horas de haberse obtenido.

En el Laboratorio cada muestra de sangre es dividido en tres porciones de 1.5 ml cada uno y colocado en alícuotas individuales, luego son incubadas a temperatura ambiente por toda la noche, previa adición de los antígenos PPD bovis, avium y buffer (Ag nil - sin antígeno) respectivamente; durante esta fase, los linfocitos T CD4 A1 de los animales infectados y sensibilizados por los bacilos *M. bovis* o *M. avium* producirán γ INF, lo cual será cuantificado en las siguientes pasos del procedimiento. Al día siguiente de la incubación, se cosecha el plasma sobrenadante e individualmente son colocados en unos pocitos para añadirles el anticuerpo monoclonal anti γ INF respectivo por una hora con el fin de que ocurra una reacción antígeno anticuerpo; seguidamente se procede al lavado con una solución buffer; acto seguido se añade el conjugado y se incuba por 60 minutos y se vuelve lavar con el buffer, finalmente se añade el substrato (enzima) por 30 minutos. Concluido el procedimiento, se realiza la lectura de absorbancia de cada reacción usando un filtro de 450 nm en el equipo de ELISA, en términos de densidad óptica (DO).

La interpretación de los resultados de la prueba de γ INF es realizado de acuerdo al siguiente protocolo:

- a. Determinación de las absorbancias de Ag Nil, PPD avium y PPD bovino de cada muestra.

b. Las absorbancias se multiplican por 1000, luego se realiza la siguiente operación:

(1) Se considera animal reactor a *M. bovis* positivo cuando:

$$\begin{array}{l} \text{Absorbancia PPD bovis} - \text{Absorbancia PPD avium} \geq 100 \text{ y} \\ \text{Absorbancia PPD bovis} - \text{Absorbancia Ag Nil} \geq 100 \end{array}$$

(2) Se considera negativo cuando:

$$\begin{array}{l} \text{Absorbancia PPD bovis} - \text{Absorbancia PPD avium} < 100 \text{ ó} \\ \text{Absorbancia PPD bovis} - \text{Absorbancia Ag Nil} < 100 \end{array}$$

5. Análisis de datos

Método Estadístico

Los resultados obtenidos fueron resumidos en una tabla de contingencia de 2x2 y se compararon los resultados de ambas pruebas diagnósticas utilizando la prueba de concordancia "Índice de Kappa", para determinar si el grado de concordancia es lo bastante suficiente como para afirmar que las pruebas se reemplazan mutuamente utilizando la prueba de Chi-2 de McNemar.

IV. Resultados

De 155 bovinos sometidos a la prueba intradérmica única, 51 (32.9%) animales resultaron reactivos positivos y 104 (67.1%) fueron considerados reactivos negativos, mientras que con la prueba γ INF sólo 32 (20.6%) animales resultaron positivos y 123 (79.4%) fueron negativos .

CUADRO N° 1.

Resultados de las pruebas diagnósticas de tuberculosis bovina

Prueba diagnóstica	Animales muestreados	Animales positivos	Proporción positivos (%)	Animales negativos	Proporción negativos (%)
PIU	155	51	32.9	104	67.1
γ INF	155	32	20.6	123	79.4

De 51 animales positivos a PIU, 27 de ellos también fueron positivos a la prueba γ INF y los demás fueron negativos. De la misma forma, de los 104 animales que resultaron negativos a PIU, solamente 5 fueron diagnosticados como positivos con la prueba de γ INF.

CUADRO N° 2

Comparación entre la PIU y γ INF en el diagnóstico de TBB

Resultados		Prueba intradérmica única		Total
		(+)	(-)	
Prueba γ INF	(+)	27	5	32
	(-)	24	99	123
Total		51	104	155

La PIU y γ INF, de acuerdo a la prueba estadística de Índice de Kappa muestran una concordancia moderada cuyo valor es 43.6%. La prueba de Chi-2 de McNemar indica que las pruebas no pueden reemplazarse mutuamente (Chi-2 calculado = 12.4, Chi-2 de tabla = 3.84).

V. Discusión

De acuerdo a los dispositivos del Ministerio de Agricultura (SENASA-PCETB) un resultado positivo a la prueba de PIU implica la realización de una segunda prueba mas compleja y trabajosa, la prueba intradérmica “doble comparativa”, la cual es determinante para decidir si un animal es eliminado (sacrificado) del hato o permanece en el mismo, esta deberá ser realizada después de 60 días de la primera prueba.

El problema del PIU es que se le atribuye una gran proporción de resultados falso positivos (sin enfermedad o infección) y también resultados falso negativos (enfermos o infectados). Este hecho conlleva a dos situaciones: el primero es el hecho de tener que realizar una segunda prueba (PDC) en un alto número de animales que en realidad serían negativos, y la segunda es que al considerar por medio de la prueba oficial los resultados falso negativo, haría que se mantenga en el hato algunos animales realmente positivos, representando estos una fuente constante de infección y hace que el hato mantenga una situación de incertidumbre en la relación a la infección por *M. bovis* (Liébana y col 1998). Así mismo, el hecho de esperar 60 días para realizar la prueba doble comparativa para poder definir la positividad o negatividad del animal de por sí ya es un inconveniente, por que permite la permanencia en el establo de algunos animales positivos contagiando a la población no infectada en ese periodo de tiempo.

Los resultados positivos de la PIU puede ser atribuida a la gran actividad antigénica cruzada existente entre las especies de micobacterias y otros géneros comunes afines, esta situación es un problema, es por esta razón que existe la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial entre animales infectados por *Mycobacterium bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina por exposición a otras micobacterias o antígenos afines (Aranaz y col. 1996). Otra limitación de la prueba son las fallas en la sensibilidad (presencia de animales falso negativos) la prueba no permite identificar a todo los animales infectados o enfermos. Esto significa que un cierto número de animales positivos quedan en el rebaño sin ser detectados por la prueba y se constituyen en fuentes de contaminación de los animales sanos.

Muchos animales recientemente infectados (con 4 – 6 semanas post infección) podrían hallarse en la fase de preanergia, entonces la reacción intradérmica a la PIU es negativa. Estos resultados falso negativos, también pueden presentarse en animales viejos con pequeños residuos calcificados en los órganos o en animales en fase terminal de la enfermedad, en vacas antes de las seis semanas post parto, animales inmunodeprimidos, vacunos desensibilizados por tuberculinizaciones previas (continuas inyecciones de tuberculina pueden dar reacciones negativas o disminuidas de tamaño), animales viejos, tuberculina de baja densidad o contaminada por bacterias, aplicación de corticoides o antiinflamatorios no esteroides. Esta situación es otra desventaja de PIU y un grave inconveniente para la erradicación de la enfermedad porque representaría una fuente de constante de infección y contaminación para el hato. (Aranaz y col. 1996; Delgado, 1998; Dirksen y col. 2005; Radostits y col., 2002).

Existen muchos casos donde un animal positivo a la PIU y la PDC (falso positivo), no presenta lesiones macroscópicas ni microscópicas, esto puede deberse a diferentes circunstancias como: animales sensibilizados por otros antígenos micobacterianos y afines (humano, aviar, Johne, de vida libre, cutáneos, etc), animales inyectados con irritantes en el lugar de la inyección

antes de leer la prueba. (en países donde la indemnización supera el valor del animal) (Dirksen y col., 2005; Radostits y col., 2002).

Los casos sospechosos de TBB determinados por la prueba intradérmica caudal o cervical, debe ser sometidos a una nueva evaluación diagnóstica de tipo diferencial por medio de la PDC. La sensibilidad de esta prueba es ligeramente mejor que la PIU; sin embargo, el hecho de no realizar la prueba de diagnóstico diferencial en aquellos animales reactivos negativos a la PIU estaría permitiendo la posibilidad que animales falso negativos se queden sin identificar, constituyéndose en potenciales agentes contaminantes de los animales sanos del hato. De otra parte, la prueba doble comparativa sólo permite diferenciar infecciones producidas por *M bovis* y *M avium*, no determina fehacientemente las infecciones debidas a otras micobacterias atípicas (*M. tuberculosis*, *M. africanum* (subtipos I y II), el bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG), y *M. microtis*, *M. pinnipedii* y *M. tuberculosis Subs. caprae*), por lo que los resultados no siempre serán claros (Dirksen y col., 2005 Radostis y col., 2002), por lo que habría la necesidad de hacer un diagnóstico diferencial frente a probables infecciones debidas con otras micobacterias afines y bacterias de otros géneros, como los causantes de actinomicosis, actinobacilosis, nocardiosis, neumomicosis y otras que producen reacción cruzada o lesiones compatibles con tuberculosis (Dirksen y col. 2005)

La baja sensibilidad de la PIU es ampliamente conocida como una desventaja o limitación de la prueba, a este hecho se suma el tener que realizar una segunda prueba mas laboriosa que involucra mayor tiempo para obtener resultados confiables. Esto debido a que la prueba doble comparativa debe de realizarse como mínimo 60 días después de la PIU. Una vez detectado un animal positivo deberá sacrificarse en un camal, hacer una inspección de vísceras y nódulos linfáticos, tomar muestras de lesiones compatibles con TBC (en muchos casos no hay lesiones) para realizar las pruebas de laboratorio correspondiente. El cultivo y aislamiento del bacilo tuberculoso es un proceso lento y difícil que dura de 6 á 8 semanas de acuerdo a los métodos

convencionales, y raras veces se obtienen resultados exitosos. Todo esto conlleva a una desazón para el propietario, llegando a desconfiar del SENASA-PCETB, sin embargo el cumplimiento de los dispositivos no dejan de ser obligatorios y conlleva a penalidades económicas en caso de incumplimiento.

El determinar fehacientemente que un animal es realmente positivo o negativo tiene una importancia económica tanto para el ganadero como para el país. La posibilidad de estar sacrificando animales falso positivos por fallas de una prueba diagnóstica, afectaría la economía de los ganaderos, por no tener derecho a reposición ni indemnización de parte del SENASA-PCETB, situación que sí es considerado en los programas de control y erradicación de esta enfermedad en otros países como: la Unión Europea, Australia, México, Colombia, etc. Es probable que esto esté ocurriendo en cierto grado, porque en la mayoría de los animales positivos sacrificados durante la necropsia y evaluación de muestras en el laboratorio, no se demuestran lesiones compatibles a TBC, ni se logra aislar al bacilo tuberculoso respectivamente. Esta situación ocasiona reclamos e inconformidad de los ganaderos debido a que en ciertas oportunidades la inversión en animales de alto valor genético se suele perder por las disposiciones oficiales que son de cumplimiento obligatorio y conlleva a la pérdida de confianza al PCETB por parte de los ganaderos, y a la credibilidad de las mismas.

Si para los ganaderos de grandes explotaciones intensivas un diagnóstico errado de TBB involucra un fuerte impacto sobre su economía, este problema será aun mas grave en las medianas y pequeñas ganaderías, en donde esta actividad representa la única fuente de ingreso familiar. La eliminación de un animal en el cual su condición de tuberculoso no es fehacientemente demostrada representaría un grave perjuicio que acarrearía importantes repercusiones de orden económico y social

Diferentes estudios han demostrando que la prueba de γ INF tiene una mejor capacidad para discriminar la condición de los animales positivos o

negativos respecto a la TBB. De allí, que en el presente estudio se demuestra una concordancia moderada entre la PIU y γ INF, con esto se estaría probando que un gran número de animales diagnosticados como positivos mediante la PIU serían producto de reacciones cruzadas debido a la baja sensibilidad que tiene esta prueba para el diagnóstico de la TBC.

En el estudio realizado, de un total de 51 positivos a PIU, sólo 27 (52.9%) animales resultaron también positivos a la prueba γ INF. Si se considera que la prueba γ INF es más sensible y específica que la PIU por que utiliza anticuerpos monoclonales para identificar el γ INF producido por los linfocitos estimulados con PPD de *M. bovis*, se podría inferir que existe un alto porcentaje de animales (34 bovinos que representa el 46.9% de los PIU positivos) que se estarían derivando a la prueba doble comparativa para decidir su real situación sanitaria, aun cuando en realidad serían negativos.

Asimismo, de los 104 animales que resultaron negativos a PIU, 5 (4.8%) de ellos resultaron diagnosticados como positivos con la prueba de γ INF. Si bien es cierto que la especificidad de la PIU es buena (baja cantidad de falso negativos), no deja de ser importante el hecho de mantener en el hato algunos animales positivos no identificados como potenciales fuentes de contagio.

De otra parte se ha demostrado que las pruebas γ INF y PIU son moderadamente concordantes y no pueden reemplazarse entre sí. Una debilidad de la evaluación mediante las pruebas estadísticas utilizadas “Índice de Kappa y Chi-2 de McNemar”, es el hecho de no enfrentar las pruebas diagnósticas a un patrón conocido (controles positivos y negativos) (patrón de oro). Los resultados encontrados eran los esperados; porque dos pruebas con diferencias significativas en su sensibilidad es poco probable que sean suficientemente concordantes; el gran número de probables animales falsos positivos de la PIU (47.1%) sería la razón de la diferencia entre las pruebas diagnósticas utilizadas. Se conoce que el γ INF es un modulador de la respuesta celular en infecciones bacterianas como el *M. bovis*, por lo que la

determinación de los niveles de producción de esta citoquina por los linfocitos sería el mejor indicativo de que un animal ha estado sensibilizado o no por el bacilo tuberculoso.

Una serie de estudios comparativos realizados al respecto, reportan que la prueba de γ INF discrimina mejor los casos positivos y negativos de tuberculosis bovina en comparación con la PIU. Por ejemplo, un estudio diseñado para determinar la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas realizado en Australia evaluaron 13000 bovinos, en dicho estudio obtuvieron una sensibilidad de 77 á 94 % con la prueba de γ INF y solamente 65% de sensibilidad de la PIU (Wood y col., 1991), similares estudios se realizaron en otros países como: Irlanda del Norte, España, Nueva Zelanda, México, EEUU, Italia, Rumanía, Brasil, entre otros, encontrando una sensibilidad que varía entre 81,8 y 100% y una especificidad entre 94 y 100%. En la actualidad la prueba de γ INF esta oficializada como prueba complementaria o confirmatoria en la mayoría de los países de la Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda, EEUU, Gran Bretaña, Irlanda, México, etc.

En un monitoreo realizado con un grupo de bovinos que no formaron parte del presente estudio, se realizó la prueba γ INF en 22 animales positivos a la PDC y se observó que 21 de estos también fueron positivos a la prueba de γ INF; dos de estos casos fueron seguidos hasta el camal y a la necropsia se encontraron lesiones compatibles con tuberculosis. De acuerdo a estos datos observados es posible especular que podría existir una significativa concordancia entre la PDC y la prueba de γ INF, igualmente podrían ser mutuamente reemplazables, de darse esta situación permitiría ahorrar un significativo tiempo y trabajo en los programas de control y erradicación de la tuberculosis, puesto que sería posible obviar la realización de la PDC, sin embargo, el número de observaciones tendría que ser el adecuado, para llegar a conclusiones valederas.

Las pruebas en evaluación tienen la capacidad de detectar animales infectados. Esto quiere decir que los animales positivos no necesariamente están enfermos, sino que pueden haber estado simplemente en contacto con el bacilo y por ello ya se encuentran sensibilizados. Ello explicaría que una serie de animales que llegan a los camales no presenten lesiones tuberculosas evidentes y que en aquellos que aparecen algunos granulomas o lesiones compatibles con TBC, no se logre aislar el microorganismo. Esto representaría una desventaja para ambas pruebas. Sin embargo, la detección de animales positivos específicamente infectados con *M. bovis* sería más fidedigna con la prueba de γ INF por el hecho de ser una prueba mucho más sensible y específica que la PIU.

Los ganaderos se han informado de estos problemas; muchos de ellos, aun sabiendo que en su establo existen animales infectados por micobacterias, se amparan en este hecho, y quieren pasar como hatos libres, en el colmo de la audacia venden animales como establos libres, a zonas indemnes de la enfermedad, con el consecuente perjuicio de la comunidad, y el retroceso de los programas de lucha y control de la enfermedad que realizan las instituciones tutelares encargadas de ello, en este caso SENASA que ve afectado su imagen y prestigio (Delgado, 2007, comunicación personal)

La ventaja de la prueba de γ INF respecto a la PIU está en el hecho de captar la respuesta de los linfocitos circulantes sensibilizados en forma específica por antígenos del *M. bovis*. La utilización de anticuerpos monoclonales anti- γ interferon, nos da una mayor seguridad de que se está detectando respuesta a infecciones debidas a estas micobacterias específicas. Se debe recordar que los linfocitos T CD4 A1 juegan un rol importante en la respuesta inmune para la tuberculosis y otros agentes bacteriales. Por los estudios realizados en diferentes países se conoce que la sensibilidad y especificidad de la prueba es alta. La evaluación se basa en la estimulación de clones de linfocitos circulantes con tuberculina PPD bovina y aviar, pero que previamente se han sensibilizados con antígenos de

M. bovis o *M. avium* y ante la estimulación correspondiente los linfocitos segregan γ INF como parte de los mecanismos de defensa celular adquirida. Los linfocitos de los bovinos no infectados con *M. bovis* al ser estimulados con el PPD bovino no producen γ INF específico a esta micobacteria, contrariamente los linfocitos de los animales infectados si secretan γ INF específico para *M. bovis* (Liébana y col. 1998).

Se conoce que una prueba diagnóstica con las características de la PIU es aceptable al comienzo de un programa de control y erradicación de una enfermedad; sin embargo, conforme avanza el programa, la prevalencia de la enfermedad disminuye, los animales falso positivos se incrementan y la proporción de animales sanos que se sacrifican son mayores. Por lo tanto, el nivel aceptable de la prueba depende de la fase control y erradicación, por lo que cerca del final de la campaña de erradicación sería necesario el uso técnicas mas sensibles y específicas (Thrusfield, 1990).

La importancia de la erradicación de esta enfermedad no sólo se basa en la necesidad de mantener un hato libre de TBC con el objetivo de obtener un mejor precio de la leche y crías; también es importante su control y erradicación debido a que esta enfermedad puede ser transmitida al hombre, por lo es considerada como una enfermedad zoonótica. En América del Sur anualmente surgen 7000 nuevos caso de TBC humana debido a *M. bovis*. La idiosincrasia, costumbre y características culturales de algunas poblaciones de nuestro país, que tienen por costumbre beber leche cruda, así como elaborar quesos, mantequilla y yogurt con leche sin pasteurizar o deficientemente pasteurizada, particularmente pobladores de la sierra y de las zonas marginales de las grandes ciudades donde existen pequeñas ganaderías, aumentan el riesgo de transmisión de la enfermedad a los hombres (Acha y Szyfres, 2003), se hace necesario que el SENASA-PCETB extienda su programa de control a este tipo de ganadería a fin de controlar este potencial problema de Salud Pública (Delgado, 1998)

VI. Conclusión

El presente estudio tuvo como objeto comparar los resultados de la prueba intradérmica única y la prueba de gamma interferón en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, considerando que la primera es una prueba oficial utilizada por el Ministerio de Agricultura del Perú - SENASA-PCETB, Las conclusiones que se determinaron fueron las siguientes:

- a. La prueba estadística de Índice de Kappa indica que existe una concordancia moderada (43.6%) entre las pruebas diagnósticas utilizadas
- b. La prueba de Chi-2 de McNemar indica que las pruebas no pueden reemplazarse mutuamente (Chi-2 calculado = 12.4, Chi-2 de tabla = 3.84).

VII. Bibliografía

1. ABDALA A. A. y TARABLA, H. D. 2003. Estimación de la prevalencia de tuberculosis bovina en el Departamento San Justo (Provincia de Córdoba, Argentina) a partir de información obtenida en frigoríficos. Anuario 2002. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina.
http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2002/a2002_p59.htm.
2. ACHA P. N. y SZYFRES, B. 2003 Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ra Ed. Washington. Organización Panamericana de la Salud. p. 14-34.
3. ANTUNICCI G. GIRADEI E. RAVIGLIONI M. C. and HIPÓLITO G. 1995. Riskfactors for tuberculosis HIV-infected persons. A prospective cohort study. *Jorn. Americ. Medic. Asoc.* 274: p 143-148.
4. ALLENDE J., HARRAEZ I., ALONSO N. 2002. Granulomas en el pulmón. Enfoque diagnóstico. V Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. www.uninet.edu/conganat/conferencias/C013/
5. ARANAZ A., LIEBANA E., MATEOS A., DOMÍNGUEZ, L. y NOVOA, C. 1996. Tuberculosis respiratoria en bóvidos. Formación continua en veterinaria. Volumen 1-Nº 4.
6. BENJAMÍN R. y DANIEL T. 1982. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to

- Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis.* 126: p 1013-1016.
7. BLOOD D. C. y HENDERSON J. A. 1976. *Medicina Veterinaria*. 3ra Ed. Editorial Interamericana. México. p 413-428.
 8. BLOOD D.C. y RADOSTITS O. M. 1992. *Medicina Veterinaria*. 7ma Ed. Vol 1. Madrid, España. Edit. Interamericana. McGraw Hill. p 729-742.
 9. CASTAGNINO D., SINGER N. y HERNDNDEZ, J. 1968. Tuberculosis experimental en alpacas (*Lama pacos*). *Rev. Fac. Med. Vet. IVITA, Lima, Bol. Extraordinario* 3: 75-77.
 10. CENTRES FOR DISEASE CONTROL. 1987. Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Morbidity and mortality weekly report.* New York City. 36: p 785-796.
 11. CONVERSE P.J., JONES S.L., ASTEMBORSKI J., VLAHOV D. 1997. Comparison of a tuberculin interferon gamma assay with the tuberculin skin test in high-risk adults effect of human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious in Diseases* 174:p 144-150.
 12. COTRAN R., KUMAR L. y ROBBINS S. 1990. *Patología estructural y funcional*. 4ta Edición, Vol 1. Edit. Interamericana. España 739 pp.
 13. CHACRA, Setiembre-1999. *Suplemento Especial Tambo Nro.7*: 10.
 14. DELGADO C. A. 1998. Tesis para optar el grado académico de Magister en Salud Animal, FMV. UNMSM.
 15. DE LA PARTE-PÉREZ M., HURTADO M.P. y RIVERA M. 2001. Tuberculosis en el nuevo milenium. *Revista de la Facultad de Medicina. Caracas- Venezuela, Volumen 24 Número 2, p 104-119.*
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079804692001000200003&script=sci_arttext.
 16. DIAZ F., BANDA V., JARAMILLO L., ARRIAGA C., GONZALEZ D., y ESTRADA C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Mex.*, 34(1) p 13-26.
 17. DIRKSEN G., GRUNDER H. y STOBER M. 2005. *Medicina interna y cirugía del bovino*. 4° Ed. Buenos Aires – Argentina. P 1110 – 1118.

18. DONDO A., GORIA M., MODA G., CESANO L., GARANZINI A., GIAMMARINO M., MINOLA G., MORICONI E., PORTA G. and MARMO G. 1996. Gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis: field evaluation of sensitive and specificity. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 13: p 14-19 .
19. DOMINGO M., LIEBANA E., VILAFRANCA M., ARANAZ A., VIDAL D., PRATS N., MATEOS A., CASAL, J and DOMINGUEZ L. 1995. A field evaluation of interferon-gamma assay in the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. In: Griffin F and Lisle G (ed) *Tuberculosis in wildlife and domestic animals*, Otago Conference Series N° 3, University of Otago Press, Dunedin, pp 304-306.
20. ENGVALL E. y PERIMANN P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunology* , 109: p 129-135.
21. FARGA V. 1982. Inmunidad en tuberculosis: modelo de inmunidad celular. *Rev Méd Chile*; 110: 608.
22. GONZALEZ L y GONZALEZ P. 2002. Tuberculosis. Argentina. <http://www.dic.org.ar/tuberculosis/TUBERCULOSIS01.pdf>.
23. GYLES C. L. y THOEN C. 1986. Pathogenesis of bacterial infections in animals. ISU Press Ames. Iowa. USA. 345 pp.
24. HESKETH J.B., MACKINTOSH C. G. and GRIFFIN, J. F. T. 1994. Development of a diagnostic blood test for tuberculosis in alpacas (*Lama pacos*). *New Zealand Veterinary Journal* 42.p 104-109.
25. JAWETZ E., MELNICK J., y ABELBERG, A. 1996. *Microbiología Médica*. 15va Edición. Editorial Manual Moderno S. A. México. 807 pp.
26. JUBB P., KENNEDY y PALMER N. 1992. *Patología de los animales domésticos*. 4ta Edición. Editorial Labor, Tomo I. 527 pp.
27. LIÉBANA E., ARANAZ A., URQUIA J., MATEOS A. and DOMÍNGUEZ, L. 1998. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust. Vet. J.* Vol. 76, N° 1, January p 50-53.

28. MANUAL MERCK DE VETERINARIA. 3ra Ed. en español. MERCK y CO. INC. Ediciones Centrium. Barcelona, España. 2000. p. 739-742.
29. MINISTERIO DE AGRICULTURA, SENASA. 2000. Reglamento para el Control y Erradicación de la TBC Bovina en el Perú.
30. MINISTERIO DE AGRICULTURA, SENASA. 2003 http://www.senasa.gob.pe/sanidad_animal/programas_zoosanitarios/ce_bruceles_tuberculosis_bovina/tuberculosis_bovina.htm.
31. MONAGHAN M. L., DOHERTY M. L., COLLINS J. D., KAZDA J: F:, and QUINN, P. J. 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40:p 111-124.
32. MONAGHAN M., COLLINS D., MCGILL K., MCMURRAY C. and KELLY, A. 1995. Field trials of the gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. In: Griffin F and Lisle G (ed) *Tuberculosis in wildlife and domestic animals*, Otago Conference Series N° 3, University of Otago Press, Dunedin, pp 300-303.
33. MONTOTO M, M. 2001. Tuberculosis enfermedad emergente, como diagnosticarla. <http://www.cih.com.br/ART.%20TBC.%20CAMO.htm>.
34. MORAR D. 2003. The development of an interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in African elephants and black rhinoceros. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters Scientiae (Veterinary Sciences). University of Pretoria, South Africa.
35. NASSAU E., PARSONS E., and JOHNSON G. 1976. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*:57: p 67-70.
36. NEILL S. D., CASSIDY J., HANNA J., MACKIE D. P., POLLOCK J., CLEMENTS A., WALTON E. and BRYSON T. 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Veterinary Record*. 135:p 134-135.
37. NIEBERLE K and COHRS P. 1967. *Special pathological anatomy of domestic animals*, Ed Pergamón Press, Oxford: p 122-130.

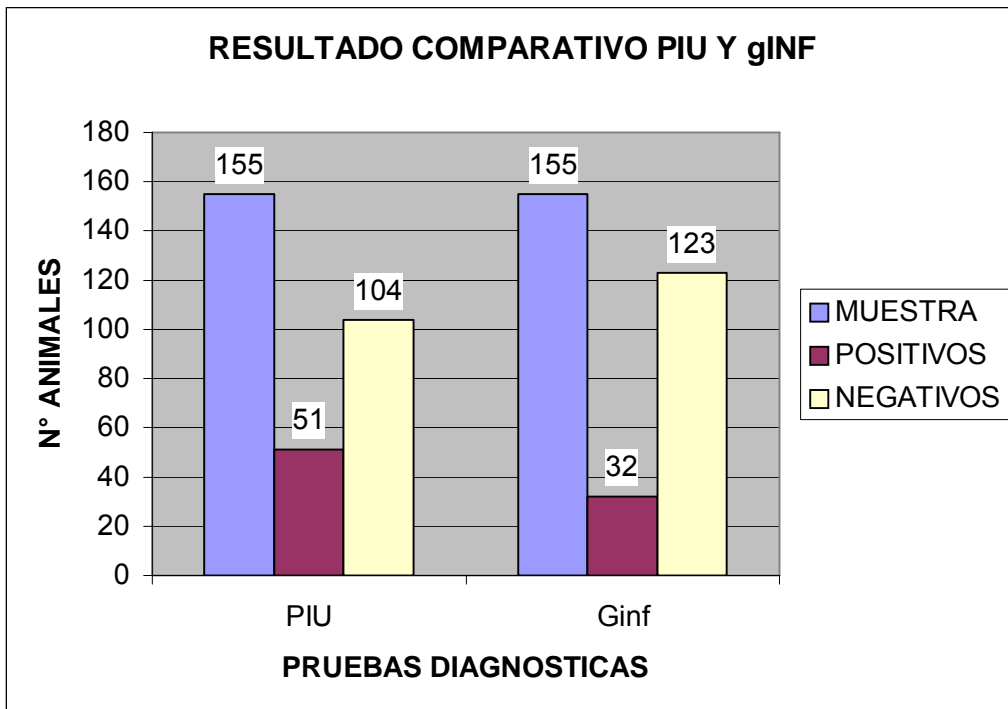
38. OSORIO M., 2001. Carta FEDEGAN N° 78, Proy Nac TBC bovina-Colombia.
39. OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2000. Comunicado de prensa, 68ª Sesión General anual del Comité Internacional de la Oficina Internacional de Epizootias 22-26 de mayo de 2000.
40. OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2004. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.
41. PRAT C., DOMÍNGUEZ J., y AUCINA V. 2000-_. *Mycobacterium bovis*. Servicio de Microbiología. Hosp. Universitario Germans Trias. Facult Medicina, Universisdad Autónoma de Barcelona, España http://www.seimc.org/control/revi_Micobac/Mbovis.htm.
42. RADOSTITS O. M., GAY C. C., BLOOD D. C. y HINCHCLIFF K. W. 2002. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9º Edición. McGraw-Hill – Interamericana de España. 1075 –1105.
43. RIEDER H. L. 1999. Bases epidemiológicas del control de la tuberculosis. Unión Internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias. París. 9 pp.
44. RIEDER H. L., CAUTHEN G.M., BLOCH A. B., COLE C. H. and HOLTZMAN D. 1989. Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Intern. Med. Florida. p 1268 –1273.
45. RITACO V., B. LOPEZ I. N., DE KANTOR L., BARRERA F., ERRICO A. y NADER A. 1991. Reciprocal and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Research in Veterinary Science. 50: 365-367.
46. ROITT I., BROSTOFF J. and MALE D. 1998. Immunology. 5º Ed. Edit. Mosby. London. 17.9 pp.
47. ROJAS M. W. 1995. Inmunología. Décima Ed. CIB. Medellín, Colombia. 139-145, 211-214, 310-31.
48. ROMERO A. ; ARRIAGA C.; TORRES R.; GUEVARA J. y GARCIA, J. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados

- nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. Vet . Mex., 37 (1) 2006.
49. ROTHEL J. S., JONES S. L., CORNER L. A., COX J. C. and WOOD P.R. 1992. The gamma interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. Aust. Vet. J. 69: pp 1-4.
 50. SLOUSON D. and COOPER B. 1990. Mechanisms of disease. 2da Ed. Edit. Williams and Williams. Baltimore, USA. 482 pp.
 51. THOEN C. O., HALL M. R., PERSBURGT. A., HARRINGTON R. and PIETZ D. E. 1983. Application of a modified enzyme-linked immunosorbent assay for detecting micobacterial antibodies in the sera of cattle from a herd in which *Mycobacertium bovis* infection was diagnosed. Taken from the proceedings of the 87 th annual Meeting of United States Animal Health Association, Las Vegas, Nevada. 603-610 pp.
 52. TIZARD I., 1995. Inmunología Veterinaria. 5a Ed. Edit. Interamericana. México. 556 pp.
 53. TORRES P. M. 2006. Situación de la tuberculosis bovina en la República de Argentina .SENASA-ARGENTINA. http://www.senasa.gov.ar/oldweb/sanidad/tuberculosis/situacion_actual.pdf.
 54. TRHUSFIELD M. 1990. Epidemiología Veterinaria. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza – España.40 pp.
 55. WHIPPLE D; BOLIN C; DAVIS A; JARNAJIN J; JOHNSON D; NABORS R., PAYEUR J., SARI D., WILSON A. and WOLF M. 1995. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. Am j Vet Res, 56: pp 415-419.
 56. WOOD P.S., CORNER L.A. and PLACKETT P. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based based on the production of gamma interferon. Research in Veterinary Science. p 46-49.

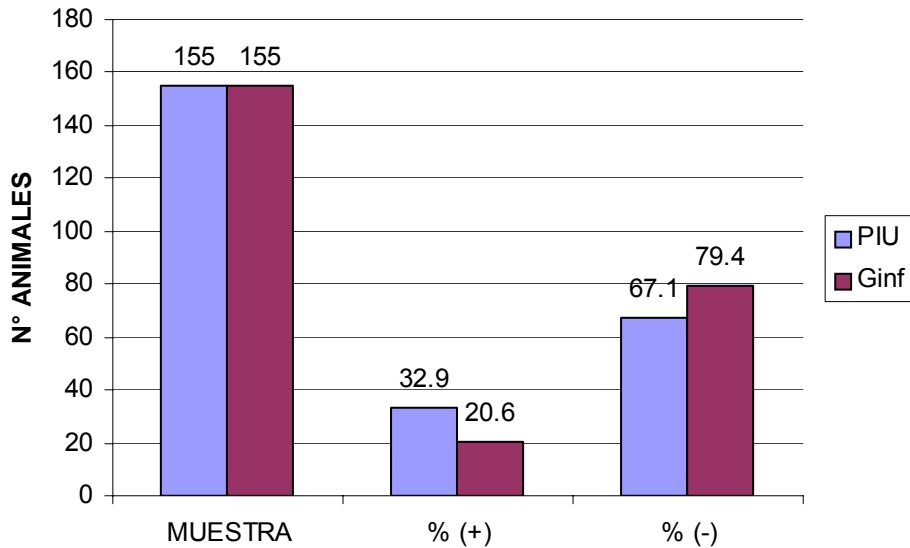
57. WOOD P. R., CORNER L. A., ROTHEL J. S., BALDOCK J. S., JONES S. L., COUSINS D.B., MCCORMICK B. S., FRANCIS B.R., CREEPER J. and TWEDDLE N. E. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust.Vet. J.* Vol. 68. 286-290.
58. WOOD P. R. and ROTHEL J. S. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology.* 125-135.
59. ZARRAGA A.M. y LEON G. 2003. Amplificación de secuencias génicas de PCR, una alternativa específica, rápida y sensible.
http://www.bioplanet.net/magazine/revistas/revista_2003_marabr.htm

ANEXOS

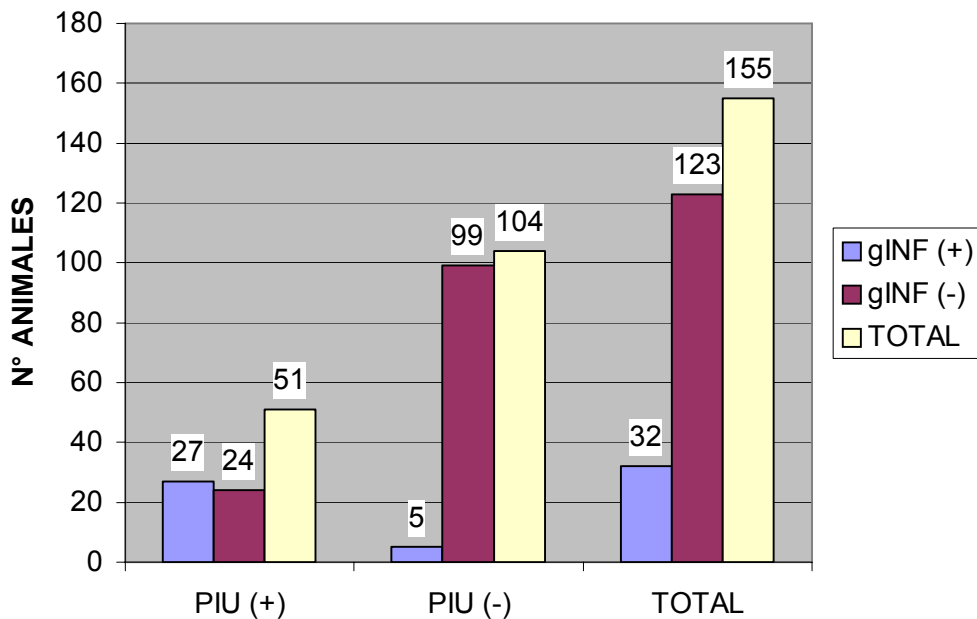
1. Gráficos



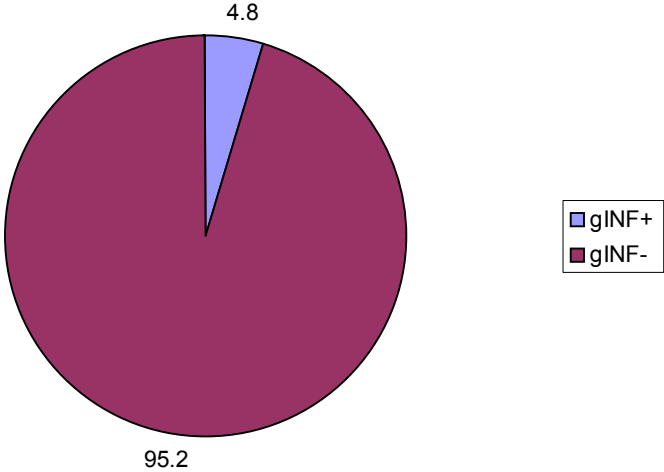
PROPORCION DE BOVINOS POSITIVOS Y NEGATIVOS A LA PIU Y gINF DE TUBERCULOSIS BOVINA



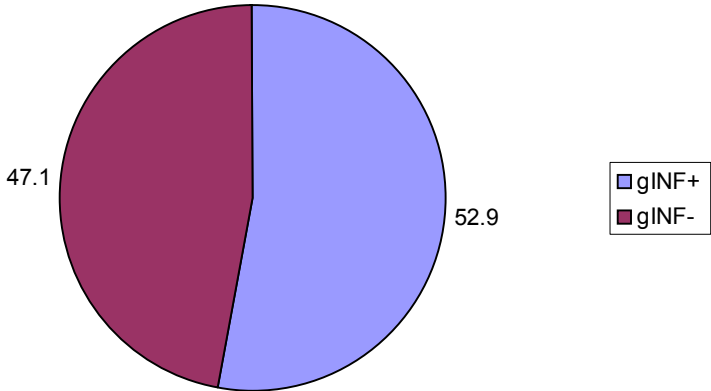
DEMOSTRACION gINF POSITIVOS DENTRO DE RESULTADOS DE PIU POSITIVOS Y NEGATIVOS



PROPORCION DE BOVINOS gINF POSITIVOS Y NEGATIVOS DENTRO DE 104 BOVINOS NEGATIVOS POR PIU



PROPORCION DE BOVINOS gINF POSITIVOS Y NEGATIVOS DENTRO DE 51 BOVINOS POSITIVOS POR PIU



2. Fotografías



Rasurado de área de inoculación PPD en tabla del cuello



Aplicación de tuberculina, zona cervical



Reacción positiva a PIU en pliegue caudal



Reacción de prueba doble comparativa