

VALORACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA TUBERCULOSIS BOVINA EN UN REBAÑO BOVINO UBICADO EN ZONA DE ALTA INCIDENCIA DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Valuation of Diagnostic Tests for Bovine Tuberculosis in Cattle Herd Located in a High Incidence Area of Zulia State, Venezuela

Sergio Rivera P.¹, José Francisco Jiménez² y Jacobus Deward³

¹ Cátedra de Inmunología, Dpto. Enf. Transmisibles, Facultad de Cs. Veterinarias, LUZ, Maracaibo, Venezuela. E-mail: srivera@cantv.net. ² Laboratorio de Zoonosis, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado, Cabudare, Edo. Lara, Venezuela. ³ Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Las pruebas de tuberculina son las de uso generalizado para el diagnóstico y el control de la tuberculosis (TBC) en el hombre y en los animales. Se caracteriza por una compleja mezcla de antígenos de mycobacterias capaces de inducir reacciones de hipersensibilidad en animales infectados, incluso con mycobacterias diferentes al *Mycobacterium bovis*, por efectos de reactividad cruzada. La preparación del derivado protéico purificado (PPD), es similar a la de la tuberculina, a diferencia de la concentración de proteínas, las cuales se separan por precipitación con agentes químicos y no por calor, aumentando su especificidad. Los primeros resultados obtenidos con las pruebas serológicas para el diagnóstico de tuberculosis bovina muestran que existe una gran reactividad antigénica cruzada entre las especies de mycobacterias, por lo que se requiere de antígenos más específicos. Se implementó un ELISA-TBC para la detección de anticuerpos anti *M. bovis*. El ensayo inmunoenzimático para el IFN- γ bovino cuando se utilizó conjuntamente con el sistema de cultivo de sangre completa resultó en un ensayo *in vitro* rápido y sensible para detectar la reactividad de la inmunidad mediada por células al *M. bovis* en el ganado infectado. A partir de estas pruebas se compararon los resultados obtenidos para establecer la sensibilidad y especificidad utilizando como prueba oro, los datos obtenidos en el cultivo bacteriológico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los animales reaccionantes a la tuberculina incluyeron animales positivos a PPD-B y PPD-A, así como animales negativos a cultivo bacteriológico y PCR. Los PPD-B positivos, no son en su totalidad, los mismos reaccionantes al IFN- γ o al ELISA-TBC. Aún cuando su sensibilidad es baja, muestra mayor especificidad y concordancia que el resto de las pruebas utilizadas.

Palabras clave: *M. bovis*, tuberculina, PPD, IFN- γ , ELISA-TBC, anérgia.

ABSTRACT

The tuberculin tests are widely used for diagnosis and control of tuberculosis (TB) in humans and animals. It is characterized by a complex mixture of mycobacteria antigens able to induce hypersensitivity reactions even in animals infected with mycobacteria other than *M. bovis*, for purposes of cross-reactivity. The preparation of purified protein derivative (PPD) is similar to the tuberculin, unlike the concentration of proteins which are separated by precipitation with chemical agents and not by increasing its specific heat. The first results obtained with the serological tests for diagnosis of bovine tuberculosis show that there is a great antigenic cross-reactivity between mycobacteria species so it requires more specific antigens. It implemented a cattle IFN- γ test and ELISA-TBC to detect anti *M. bovis* activity. The immunoassay test for IFN- γ used in conjunction with the cropping system of whole blood resulted in an essay *in vitro* rapid and sensitive to detect the reactivity of the cell-mediated immunity to *M. bovis* in livestock infected. Comparative test of the tuberculina, test of Gamma Interferon (INF- γ) and a test ELISA-TBC, soon was taken to slaughter house to take lymphoid tissue samples and nodules, to which the test of chain reaction of Polimerasa was applied to them, to bacteriological culture and (PCR), for the identification from the pathogen. From these tests the patterns of immune response settled down and the obtained results of the different tests were compared to establish sensitivity and specificity using with t gold standard, the data collected in culture and PCR. The results were analyzed using the statistical method of analysis of variance for nonparametric tests. The PPD B-positive, are not the same reacting to IFN- γ or at ELISA-TBC.

Although its sensitivity is low, it shows greater specificity and consistency as the rest of the tests used.

Key words: *M. bovis*, tuberculin, PPD, IFN- γ , ELISA-TBC, anergy.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (*Bos taurus-indicus*) posee importancia, no sólo porque produce grandes pérdidas económicas al sector ganadero, sino porque es una enfermedad transmisible al hombre y otros animales. La infección con el *Mycobacterium bovis* ocurre principalmente en aquellas zonas geográficas donde predominan las explotaciones pecuarias relacionadas con la producción de leche y sus derivados. Los casos de infección del hombre se dan en las personas que están en contacto con estos animales, y se caracterizan por prevalecer las formas extra pulmonares [2, 14,15].

La gran cantidad de datos de campo de los programas de control de la tuberculosis bovina muestran que, existe una gran variación en la prevalencia en las regiones geográficas y entre fincas dentro de esas regiones. Ejemplo de lo anterior es el hecho de que, la incidencia de la enfermedad es más alta en fincas lecheras que en fincas de ganado de carne. Mientras que algunas de las variaciones entre rebaños y regiones pueden ser consecuencia de sistema de manejo escogidos y la oportunidad en la cual se favorece la transmisión de la infección y el desarrollo de la enfermedad; así por ejemplo, la estabulación total o parcial de los bovinos, factor importante del mantenimiento de la enfermedad en el rebaño y el diagnóstico oportuno para la eliminación de animales infectados [5, 9].

El diagnóstico de la tuberculosis bovina es difícil emitirlo debido a la falta de signos visibles en la mayoría de los casos, sólo en un número muy pequeño de éstos es posible observar animales con enflaquecimiento progresivo, pelaje áspero y seco, diarrea intermitente y lesiones pulmonares. Aún en estos casos es fácil confundir esta enfermedad con otros que presentan un cuadro clínico similar [1,5].

El aislamiento y cultivo es el único método de diagnóstico definitivo de la enfermedad. La inoculación experimental en animales de laboratorio, especialmente los cobayos (*Cavia porcellus*) y los conejos (*Oryctolagus cuniculus*), una vez inoculados muestran lesiones compatibles a tuberculosis de donde se toman muestras para ser llevada a cultivo y posterior identificación.

Las pruebas de tuberculina, son las de uso generalizado para el diagnóstico y el control de la tuberculosis en el hombre y en los animales. Robert Koch fue el primer científico que describió la reacción de tuberculina, como un ensayo para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis en humanos, en 1891 [5]. Las inyecciones de tuberculina en individuos infectados eran seguidas por episodios de fiebre, vómitos y escalofríos, los cuales perduraban por varias horas. En individuos no infec-

tados, no se presentaban ninguno de esos síntomas. La técnica, posteriormente fue adaptada a los bovinos, cuando se descubrió que los animales tuberculosos daban una respuesta térmica después de la inyección subcutánea de 0,2 - 0,5mL de tuberculina. En los primeros reportes de la evaluación de esta prueba se mencionaba que, una alta proporción del ganado que reaccionaba, presentaba lesiones tuberculosas a nivel de matadero y se creía que la prueba detectaba 90-95% del ganado tuberculoso. Esta prueba era laboriosa y se requería de mucho tiempo, para medir la temperatura corporal en los animales inoculados con la tuberculina. A pesar de esto, esta prueba de inyección subcutánea de tuberculina fue utilizada a gran escala en Europa en la última década del siglo XIX. En EUA, el uso de esta técnica, combinada con sacrificios de animales reactores en el distrito de Columbia, entre 1909 y 1918, redujo el porcentaje de ganado tuberculoso de 18,87 a 0,84%. En 1908, Moussu y Mantoux fueron los primeros en describir esta prueba de tuberculina, pero mediante la inyección intradérmica a nivel de la base de la cola en el ganado. En diferentes investigaciones se encontró lesiones tuberculosas en 96,12% de 9.226 animales que reaccionaron a la prueba subcutánea y en 96,17% de 4.171 animales que reaccionaron a la prueba intradérmica. Esta prueba intradérmica de tuberculina en la base de la cola, se adoptó como la prueba oficial en Estados Unidos a partir de 1920 [1, 5, 21].

La infección por mycobacterias produce en el hospedador una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada a las proteínas de origen bacilar. Al inyectar la tuberculina por vía intra-dérmica, esa hipersensibilidad se manifiesta por una inflamación en el sitio de la inyección, la cual se siente dura al tacto y aumentada de volumen. Esta reacción se debe leer, tanto en el hombre como en los bovinos, a las 72 horas post-inoculación [5,12, 20,21]. El término tuberculina se aplica a un extracto obtenido de filtrados de cultivos mycobacterianos, previamente esterilizados. Las mycobacterias son cultivadas en medio líquido, muertas por calor y separadas por filtración. El líquido filtrado es luego concentrado por calor hasta un décimo de su volumen original. La tuberculina fue preparada por primera vez por Robert Koch en 1890 (Tuberculina antigua; Old tuberculin, O.T.). En los primeros tiempos se empleaba como medio de cultivo el caldo de carne glicerinado, que posteriormente fue reemplazado por medio sintético (HCSM). Con ello se evitaba agregar al producto final, proteínas heterólogas provenientes del medio de cultivo [12].

La preparación del PPD es similar a la de la tuberculina, la diferencia está que, en lugar de concentrar las proteínas por acción del calor, se les separa por precipitación con agentes químicos, tales como: el sulfato de amonio o el ácido tricloroacético [12]. De esta manera, se logra elaborar un producto estandarizado y conservar mejor la estructura proteica original. Tanto las tuberculinas como los PPD contienen además de proteínas, otros antígenos de composición bioquímica variable [3,18].

Los primeros trabajos sobre el desarrollo de métodos *in vitro* para medir la reactividad de los linfocitos T, de células

provenientes de bovinos infectados con *M. bovis* se enfocó en la prueba de transformación linfocitaria (LTT). Esta prueba LTT fue capaz de detectar una respuesta antígeno-específica a antígenos de PPD, pero tenía una serie de desventajas, para ser considerada como una prueba que pudiese reemplazar a la prueba de tuberculina [6, 23]. El requisito de aislar los linfocitos fue eliminado por el uso de sangre completa, diluida en los medios de cultivo [6, 20, 22, 23], sin embargo, estos ensayos continuaban teniendo las otras limitantes. Se estableció que estos ensayos eran útiles con fines de investigación por ser muy complejos, costosos y lentos si se querían para reemplazar a la prueba de tuberculina.

Se desarrolló entonces un sistema de incubación de sangre completa y se examinó la liberación de una citocina, el interferón IFN- γ , como el indicador de una respuesta positiva a los antígenos del PPD de origen bovino. Inicialmente nació como un bioensayo para detectar la presencia de IFN- γ , el cual mostró una buena correlación con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación linfocitaria [17]. Subsecuentemente se produjeron anticuerpos monoclonales contra IFN- γ recombinante bovino [17, 22]. Luego, utilizaron estos anticuerpos para desarrollar un inmunoensayo enzimático (EIA) para IFN- γ , [17]. El ensayo inmunoenzimático para el IFN- γ bovino cuando se utilizó conjuntamente con el sistema de cultivo de sangre completa resultó en un ensayo *in vitro* rápido (en 24 horas) y sensible para detectar la reactividad de la inmunidad mediada por células al *M. bovis* en el ganado infectado [21-23].

Una de las ventajas del ensayo del IFN- γ con relación a la prueba de tuberculina es que la prueba puede repetirse cuando se desee sin que se presente ningún tipo de inconveniente ya que no se inyecta ningún tipo de antígeno a los bovinos. Se ha mostrado que la respuesta a la prueba de tuberculina disminuía a un nuevo enfrentamiento antigénico por un período de 60 días por lo que al ganado no se le debe aplicar la prueba durante ese período. Otra ventaja de la prueba del IFN- γ es, desde el punto de vista práctico, que se tiene que recoger al ganado una sola vez para la toma de muestra de sangre; en cambio para la prueba simple de tuberculina se tiene que recoger, dos veces, una para la inoculación del PPD y otra para realizar la lectura. De la misma manera, en la prueba del IFN- γ , la interpretación de los resultados es objetiva, ya que éstos se expresan en forma numérica; en la prueba simple a la tuberculina (PST) los resultados de la misma se expresan en términos de positividad o negatividad, en base al criterio de interpretación del médico veterinario que realiza la prueba [17,22].

El ensayo del IFN- γ fue aprobado por el gobierno australiano como una prueba para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Igualmente en Estados Unidos fue aprobado para ser utilizado como una prueba complementaria en el programa de erradicación de la tuberculosis bovina. En Estados Unidos se realizó una evaluación, a nivel de campo, de la prueba del IFN- γ en un rebaño de bovinos que se sabía estaban infectados con *M. bovis*, en ese estudio compararon la sensibilidad de la prueba simple de tuberculina y la prueba del IFN- γ . Obtuvieron una sensibilidad de la PST de 80,4 - 84,4% según el estándar de comparación. La sensibilidad de la prueba del IFN- γ estaba en entre el 55,4 - 97,1% según el estándar de comparación y el método de interpretación [22].

Los primeros estudios serológicos de la tuberculosis bovina incluían una gran variedad de pruebas de floculación en bentonita, la prueba de aglutinación [1], la prueba de anticuerpos fluorescentes indirecta y la prueba de fijación de complemento [1, 11, 12]. Todos estos sistemas usaron preparación cruda de anticuerpos y mostraron gran reactividad cruzada con sueros de bovinos no infectados y con suero de animales con infecciones producidas por otras mycobacterias. Igualmente mostraron muy baja sensibilidad y especificidad. El hallazgo importante de estos estudios fue la correlación existente entre altos títulos de anticuerpos y la severidad de la infección [11]. En los primeros estudios, sobre el uso de un ELISA se reportó una sensibilidad de 90% y una especificidad de 89,8% en la detección de tuberculosis bovina. Sin embargo, en un estudio más extenso, el mismo grupo mostró una sensibilidad más baja a la prueba de ELISA [11]. De los primeros resultados obtenidos con las pruebas serológicas para el diagnóstico de tuberculosis bovina se reconoce que, debido a la gran reactividad antigénica cruzada entre las especies de mycobacterias, se requiere de antígenos específicos para desarrollar pruebas serológicas altamente específicas. El alto nivel de reactividad antigénica cruzada entre las mycobacterias, puede ahora ser explicado ya que los principales antígenos de *M. bovis* se han aislado y secuenciado. Se ha reportado el uso de una proteína específica de *M. bovis* (MPB70) en un ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, lo cual mejoró grandemente la especificidad de éste ensayo, pero la sensibilidad era baja [7].

Uno de los principales avances logrado hasta el día de hoy en relación a la tuberculosis ha sido el control de la transmisión de la enfermedad. Para lograr este control se requiere de la investigación minuciosa de la epidemiología de la infección por mycobacterias del complejo *M. tuberculosis*. En años recientes se han fabricado sondas de ADN y están disponibles para el estudio de la epidemiología de la tuberculosis mediante las técnicas del ADN *fingerprinting*. Estos métodos facilitan la identificación de diferentes cepas de *M. tuberculosis*. Las técnicas del ADN *fingerprinting* están integradas a las técnicas convencionales de epidemiología con la finalidad de tener un mejor conocimiento de la dispersión de la tuberculosis. Esta técnica de biología molecular (ADN *fingerprinting*) ha llevado a la investigación de una amplia variedad de hechos epidemiológicos, tales como: identificación adecuada de brotes, estudio de infecciones intrahospitalarias y la investigación de la contribución relativa de infecciones recientes versus infecciones por reactivación en diferentes poblaciones [4, 18, 19].

El método más popular del ADN *fingerprinting* de mycobacterias del complejo *M. Tuberculosis*, es el análisis de hibridación del Southern blot usando elementos de ADN repetitivos como sondas. El elemento de inserción que mejores resultados ha dado ha sido el IS6110, con éste, se visualiza mejor la variación de cepas

que existen en el bacilo tuberculoso, ya que el polimorfismo del ADN detectado por el IS6110 es muy alto entre aislados clínicos no relacionados y la estabilidad de este elemento en el cromosoma de la mycobacteria, es muy alta. Este marcador genético está siendo ampliamente usado en varios estudios epidemiológicos, así ha sido usado en la identificación de brotes de tuberculosis buscando la relación entre pacientes, entre personas que han estado en contacto con pacientes y que posteriormente desarrollan la enfermedad, entre vecinos, en prisiones o en cárceles y en hospitales [4].

El objetivo de este trabajo fue el valorar las pruebas diagnósticas PPD-B, INF- γ , ELISA-TBC, Cultivo bacteriológico y PCR, para la detección de animales infectados con el *M. bovis*, reactores positivos a la tuberculinización, realizada por organismos oficiales en una zona de alta incidencia de la tuberculosis bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo observacional transversal, cuyo análisis de los resultados están basados en un estudio de tipo analítico.

Para confirmar el diagnóstico de bovinos infectados con tuberculosis, se evaluó una finca de 6.000 animales, con antecedentes de tuberculosis bovina por más de 10 años, ubicada en la zona de Santa Bárbara, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela, cuya prevalencia sostenida era de 1%, superior a la reportada para todo el país (0,02%) [9]. Se seleccionaron para este estudio dos lotes de animales, descartados por el Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) utilizando el criterio del reactor positivo a la prueba oficial vigente del programa de erradicación de la tuberculosis en Venezuela, en los dos períodos climáticos existentes en Venezuela (Lluvia y sequía).

Todos los animales evaluados fueron beneficiados al finalizar el período de pruebas de laboratorio para culminar con la inspección *post mortem* a nivel de matadero, con miras a observar macroscópicamente lesiones tuberculoideas y tomar posteriormente las muestras para cultivo bacteriológico y el PCR. A estos dos grupos de animales se les aplicaron las pruebas diagnósticas siguientes: prueba comparativa del PPD intradérmico (PPD-B y PPD-A), respetando los 60 días de intervalo con la prueba anterior [2, 5, 12], la prueba del Interferón Gamma (INF- γ) propuesta por Word y col. [16, 20-22] y la prueba de ELISA, fundamentada en la utilizada por Lilebaum y col. [11].

Una vez probados todos los animales positivos a tuberculina, según el criterio de los médicos veterinarios oficiales del INSAI, fueron llevados a matadero para su beneficio, cumpliendo con la normativa vigente en Venezuela (MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL Y AGRICULTURA Y CRIA. Estados Unidos de Venezuela - Ministerio de Sanidad y Asistencia Social- Dirección General de Salud Pública - Número 19 - Ministerio de Agricultura y Cría- Dirección de ganadería - Número 3 - Caracas, 10 de Junio de mil novecientos cincuen-

ta y dos) para el control y erradicación de la tuberculosis bovina. Posteriormente se procedió a la inspección *post mortem* reglamentaria, para verificar la presencia de lesiones tuberculoideas macroscópicas de los linfocentros regionales como son el linfocentro retrofaringeo, linfocentros de la cadena mediastínica y de otros órganos que pudiesen estar afectados en el proceso infeccioso, especialmente pulmones e intestino. Además se tomaron en cuenta para esta evaluación, cualquier otro órgano que presentase lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis bovina. A nivel de matadero se contó con la colaboración del médico veterinario adscrito al Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social (MSDS). Se tomaron muestras de tejido y nódulos linfocitos descritos anteriormente, para tratar, de aislar al *M. bovis* a través de cultivo bacteriológico y/o detectar presencia de su ADN específico por PCR. Una vez obtenido crecimiento en los medios de cultivo correspondientes, éstos se sometieron a pruebas bioquímicas y PCR para confirmar, de manera definitiva, la identificación de la mycobacteria.

Todas las muestras recolectadas fueron llevadas y procesadas en el laboratorio de Zoonosis del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Barquisimeto, estado Lara, Venezuela y al laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas, Caracas, Venezuela para su posterior procesamiento.

Prueba Comparativa del PPD intradérmico

A todos los animales se les aplicó la prueba comparativa del PPD, la cual consiste en inocular a nivel de la tabla del cuello, específicamente en su tercio medio, de manera simultánea en dos lugares separados y en el mismo lado del cuello, PPD bovino (PPD-B) y PPD aviar (PPD-A), con 12 cm. de distancia entre los dos puntos de inoculación para detectar infección con *M. bovis* o *M. avium* subsp. paratuberculosis, rasurando los sitios de inoculación y midiendo el grosor de la piel con un vernier o un micrómetro (Vernier Caliper, China) previo a la inoculación. Una vez inoculados los PPD se procedió a la lectura de esta prueba a las 48 ó 72 horas post-inoculación midiendo nuevamente el grosor de la piel con el mismo implemento. Un aumento de 3 mm con respecto a la primera lectura, discriminó al animal como positivo a tuberculosis o paratuberculosis, dependiendo de que sitio resultara con el aumento del grosor de piel superior a los 3mm [12, 21].

Prueba de Interferón Gamma (INF- γ)

A todos los animales se les extrajo 5mL de sangre de la vena yugular utilizando el sistema de venoyect® y tubos vacutainer® estériles, tapa verde, con heparina sódica (Benton Dickinson, EUA) antes de ser llevados a matadero.

Esta sangre fue transportada al laboratorio de Zoonosis del DCV- UCLA a temperatura 37°C y en un lapso no mayor de 18 horas; después de tomada la muestra, se realizó la prueba de INF- γ utilizada en varios países como prueba oficial de diagnóstico de tuberculosis bovina [23], que consiste en cultivar 1,5

mL sangre completa por triplicado en placas de cultivo de 24 pozos, fondo plano, estériles, colocando en el primer pozo como antígeno estimulante 100 μ L de Buffer Fosfato Salino (PBS), en el segundo pozo 100 μ L de PPD bovino y en el tercer pozo 100 μ L de PPD aviar. Esta placa se incubó de 24 a 30 horas a 37°C y con 5% de CO₂. Posterior a la incubación (LAB-LINE Instruments, Inc. Modelo: 417-10, vip imperial II CO₂ incubator, EUA) las placas se sacan de la incubadora y se procede a recolectar el plasma de cada pozo colocándolos en tubos Eppendorf y tomando por lo menos 300 μ L de plasma. Una vez obtenido el plasma se procede a la detección del INF- γ en el plasma utilizando el Kit de Bovigan (CSL, Veterinary Division, Victoria, Australia); los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados de las otras pruebas de diagnóstico utilizadas, se analizaron los resultados a través de pruebas de sensibilidad, especificidad, concordancia, discordancia, índice de confiabilidad, OR y pruebas no paramétricas [22, 23].

Prueba de ELISA-TBC

Para la realización de esta prueba se procedió a tomar 5 mL de sangre de la vena yugular a ambos grupos de animales, utilizando el sistema de venoyect® y tubos vacutainer® estériles, tapa roja, sin anticoagulante (Benton Dickinson, EUA) antes de ser llevados a matadero. Estos tubos, una vez obtenidas las muestras se colocan en forma inclinada con ángulo de 45° para la formación de bisel, que facilita la extracción del suero sanguíneo. Una vez extraído el suero sanguíneo, las muestras de suero fueron transportadas al laboratorio de Zoonosis a 4°C en cava y con geles refrigerantes, en el laboratorio se congelaron a -20°C (congelador horizontal, Magic Chef, Canada) hasta su procesamiento. A estos sueros se les aplicó una prueba de ELISA para la detección de IgG contra *M. bovis*, para lo cual se diseñó un ELISA (ELISA in house) como lo desarrollaron Lilembaum y col. [11], utilizando como antígeno al PPD bovino y como conjugado IgG bovina con peroxidasa (Sigma, EUA) como sustrato se utilizó ABTS (SIGMA, EUA). Los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados de las otras pruebas de diagnóstico.

Diagnóstico del *M. bovis*, a través de aislamiento y cultivo bacteriológico

Esta prueba de diagnóstico se utilizó como técnica de referencia en conjunto con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) secuencia específica, a partir de muestras tomadas de los tejidos, con o sin lesiones tuberculosas provenientes de la inspección *post mortem* realizada a nivel de matadero, durante la inspección sanitaria de los animales.

Una vez que las muestras de tejido o nódulos linfoides recolectadas llegaron al laboratorio de Bacteriología, se procedió a la siembra, cultivo y aislamiento primario.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: El medio de Stonebrink y el medio de Lowestein-Jensen; como método de descontaminación se utilizó el método de Ogawa modificado por Kudoh [12].

Las muestras recolectadas de nódulos linfoides o cualquier tejido con lesión sospechosa a TBC, presentes en los focos caseosos, fueron tomadas directamente con el asa de platino o con un hisopo estéril, para sembrar en el medio de cultivo descontaminante, utilizando el método indicado anteriormente. Las muestras seleccionadas sin lesión aparente macroscópicamente, se cortaron en pequeños trozos con una tijera o bisturí, para posteriormente colocarlas en un mortero con arena lavada estéril agregándole de 2 a 3 mL de fosfato trisódico al 10% para proceder al macerado del tejido, luego se procedió a descartar el sedimento para obtener el jugo del macerado, al cual se le añadió de 4 a 5 mL más de fosfato trisódico al 10% y se dejó en reposo por 24 horas en un tubo de ensayo. Posteriormente se procedió a la descontaminación por el método de Ogawa modificado por Kudoh al jugo o papilla obtenida del tejido macerado, impregnando un hisopo estéril con el jugo, para luego ser sumergido en un tubo con NaOH al 4% por 2 minutos. Se sacó el hisopo con cuidado para que no se pegara a la pared interna del tubo.

La siembra se realizó por triplicado inmediatamente después de la descontaminación, utilizando dos tubos de medio de Stonebrink y un tubo de medio de Lowestein-Jensen. Los tubos se incubaron a 37°C, durante 8 semanas, evaluando los tubos sembrados diariamente en la primera semana y después se observaron una vez a la semana.

Cuando aparecieron las colonias de crecimiento sobre los medios sembrados, se hicieron frotis para colorearlos con Ziehl Neelsen e identificar los bacilos ácido alcohol resistente (BAAR). A todos aquellos cultivos que resultaron BAAR positivos se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para identificar *M. bovis*:

- Prueba de la Catalasa:

→	A temperatura ambiente.
→	A 68° C.
- Reducción de Nitratos.
- Prueba de la Pirasinamidasa.

Las colonias identificadas como *M. bovis*, fueron confirmadas por PCR. Los resultados obtenidos en esta prueba se analizaron igualmente, comparándolos con el resultado de otras pruebas diagnósticas utilizadas.

Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

De las muestras de tejido tomadas para cultivo, negativas al cultivo bacteriológico, se extrajo una pequeña porción la cual fue utilizada para la extracción de ADN de *M. bovis* aplicando la técnica de PCR primer específico para *M. bovis* [4, 8].

Se tomó aproximadamente 1 g de tejido sospechoso, el cual se colocó en 500 μ L de Buffer Tris EDTA en tubos Eppendorf introduciendo dichos tubos en baño María a 80°C (Lab-Line Aquabath, EUA) por 1 hora, para destruir las bacterias que estuviesen vivas, preservando el ADN de las mismas. Para la

lisis del tejido se le agregó Buffer de lisis en proporción 1/10 y se incubó por 24 h a 37°C [8,10].

Una vez disuelto todo el tejido se trasvasa en tubos Eppendorf estériles y se procede a la extracción del ADN siguiendo el protocolo utilizado por Hernández Pando [8].

Una vez obtenido el ADN se monta la PCR utilizando los primers que detectan el complejo tuberculoso sonda IS6110 y los primers específicos *pncA* y *oxyR*, que permitieron identificar al *Mycobacterium* como *M. bovis* [10].

Análisis estadístico

La sensibilidad de una prueba se refiere a la habilidad que tiene esa prueba de identificar correctamente a los animales con la infección, es decir, animales infectados. La especificidad se refiere a la habilidad que tiene esa prueba de identificar correctamente aquellos animales, no infectados.

Cuatro resultados posibles se presentan:

- Bovinos tuberculosos detectados por la prueba (Verdaderos positivos).
- Bovinos no tuberculosos, positivos a la prueba (Falsos positivos).
- Bovinos tuberculosos, negativos a la prueba (Falsos negativos).
- Bovinos no tuberculosos, negativos a la prueba (Verdaderos negativos).

$$\text{Sensibilidad} = a / a + c$$

$$\text{Especificidad} = d / b + d$$

La Concordancia y la Discordancia simples miden la proporción de acuerdos respecto al total de observaciones y permite establecer comparaciones globales utilizando las fórmulas siguientes:

$$\text{Concordancia} = a + d \times 100 / N$$

$$\text{Discordancia} = c + b \times 100 / N$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muestras que resultaron positivas al cultivo bacteriológico del *M. bovis* (FIG. 1), resultaron igualmente positivas a la PCR aplicada al ADN extraído de las *Mycobacterias*, amplificando con primers específicos del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, IS6110 que incluye al *M. bovis* (FIG. 2). Todas las muestras negativas al cultivo bacteriológico, provenientes de tejidos involucrados en la infección con *M. bovis*, con o sin lesiones tuberculosas, resultaron negativas a la prueba de PCR anteriormente señalada. En total, hubo 51 animales positivos y 85 animales negativos. Por tal motivo, ambas técnicas fueron seleccionadas como pruebas "Oro" o de referencia para evaluar el comportamiento del resto de las pruebas diagnósticas aplicadas en este estudio.



FIGURA 1. CULTIVO DE MYCOBACTERIUM BOVIS EN MEDIO DE STONEBRINK PH 6,4. SE OBSERVAN COLONIAS CONVEXAS DE COLOR OCRE. DE CULTIVO COMO ESTE SE TOMÓ PARA REALIZAR PRUEBAS DE PCR USANDO LA SONDA IS6110. DONDE NO HUBO CRECIMIENTO SE TOMÓ UNA MUESTRA DE TEJIDO PARA SER ANALIZADAS CON LA MISMA SONDA/ CULTIVATION OF *Mycobacterium bovis* IN STONEBRINK MEDIUM pH 6.4. WERE OBSERVED CONVEX COLONIES OCHER. GROWING AS THIS IS TAKEN TO MAKE THE TEST USING PROBE IS6110 IN PCR TEST. WHERE THERE WAS NO GROWTH TOOK A SAMPLE OF TISSUE TO BE ANALYZED WITH THE SAME PROBE.

Lo ideal sería que, una prueba indirecta tenga una sensibilidad y especificidad del 100% pero las pruebas biológicas nunca serán ejecutadas a este nivel de seguridad y más aún, existe una correlación negativa entre esos dos parámetros. Ej.: Si el punto de corte se baja, se detecta mayor número de animales positivos pero, de la misma manera, aumentarán los animales determinados sanos, realmente falsos positivos.

La prueba comparativa PPD-B/PPD-A detectó 34/51 animales positivos con una sensibilidad de 0,67 y una especificidad de 0,76 con una concordancia del 76% y una Discordancia de sólo 27%, resultados muy superiores a los obtenidos por las pruebas de IFN- γ y ELISA-TBC (TABLAS I, II y III).

Los animales PPD-A positivos/ PPD-B negativos, positivos a la prueba simple de la tuberculina aplicada por los oficiales del SASA, se calificaron como falsos positivos. Estos casos se pueden dar cuando existen infecciones debidas a otras *Mycobacterias* diferentes al *M. bovis*, por la existencia de antígenos comunes, que no van seguidas necesariamente de enfermedad en el bovino. Prácticamente esas reacciones para-específicas son las que adquieren mayor importancia relativa en las etapas de prevalencia muy bajas de la tuberculosis bovina. En el caso contrario, los falsos negativos, se pueden presentar en los bovinos en la fase temprana de la infección (período pre-alérgico), en el curso de infecciones intercurrentes (viro-sis), o en animales en estado caquéctico. Los resultados falsos, llamados errores de clasificación, señalan el nivel de fiabilidad de la prueba indirecta y además producen dificultades,

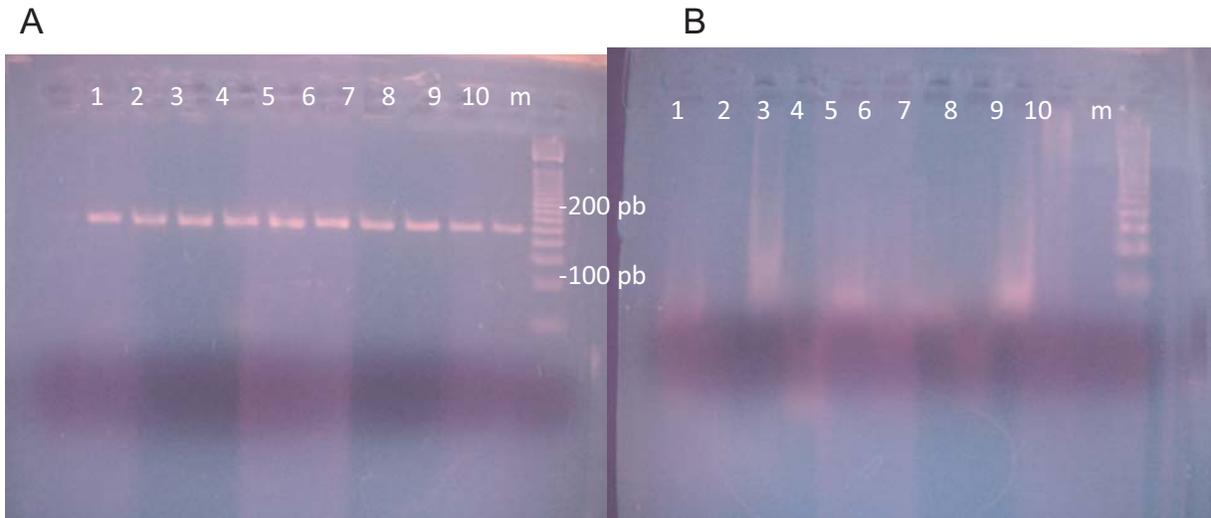


FIGURA 2. IDENTIFICACIÓN DE *M. bovis* PROVENIENTE DE MUESTRAS DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO Y/O MUESTRAS DE TEJIDO. A) SE EVIDENCIA LA BANDA QUE DETERMINA EL COMPLEJO *M. tuberculosis* AL UTILIZAR LA SONDA IS6110. B) MUESTRAS NEGATIVAS/ IDENTIFICATION OF *M. bovis* FROM BACTERIOLOGICAL OR TISSUE SAMPLES. A) THE BAND IS EVIDENCE THAT DETERMINES THE COMPLEX *M. tuberculosis* BY USING THE PROBE IS6110. B) NEGATIVE SAMPLES.

**TABLA I
VALORES OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PPD BOVINO (PPD-B)/
SAMPLE VALUES FROM SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF BOVINE PPD (PPD-B)**

PPD-B	Infectados		Total
	+	-	
+	34	20	54
-	17	65	82
	51	85	136

Sensibilidad: 0,67 Especificidad: 0,76
Concordancia= 73% Discordancia= 27%

**TABLA II
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL IFN- γ PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA/
SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF IFN- γ FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS.**

IFN- γ	Infectados		Total
	+	-	
+	20	38	58
-	31	47	78
	51	85	136

Sensibilidad: 0,40 Especificidad: 0,55
Concordancia= 49% Discordancia= 50%

tanto en la estimación de la prevalencia de la tuberculosis, como en la toma de decisiones para la aplicación de medidas sanitarias tendientes a la erradicación de la enfermedad [1,12].

Una revisión de los pocos datos disponibles sugirió que, la prueba simple caudal de tuberculina, usando la tuberculina

**TABLA III
VALORES OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ELISA-TBC/ VALUES OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ELISA-TBC**

ELISA- TBC	Infectados		Total
	+	-	
+	20	41	61
-	31	44	75
	51	85	136

Sensibilidad: 0,40 Especificidad: 0,52
Concordancia = 44% Discordancia= 52%

HCSM, tenía una sensibilidad de 87,9% y una especificidad de 90,8%, mientras que, usando el PPD de origen bovino, mostraba una sensibilidad de 81,9% y especificidad de 96,3% [21-23]. Sin embargo, los resultados de evaluaciones a nivel de campo en Australia sugieren que la sensibilidad de la prueba caudal de la tuberculina es moderada (65,6 a 72%) [23], mientras que la especificidad era alta (96 - 98,6%), respectivamente. La prueba simple intradérmica de tuberculina en el cuello demostró tener gran sensibilidad. La prueba oficial en Venezuela para el diagnóstico de la tuberculosis bovina es la prueba simple de la tuberculina, aplicada en la región caudal, para la cual se ha reportado una sensibilidad aproximada de 70% y una especificidad de 68% [5,9,22].

La prueba del IFN- γ es una prueba cuya sensibilidad y especificidad se encuentra reportada por encima del 90% [17, 22]. Estos valores de sensibilidad y especificidad no concuerdan con los obtenidos en Venezuela, los cuales oscilan entre un 50 y un 60%, muy por debajo de los reportados por otros países [17]. Entre 1989 y 1990, se llevaron a cabo varios estudios a nivel de campo con la finalidad de comparar la sensibilidad y especificidad del ensayo del IFN- γ y la prueba simple de tuberculina [17]. La especificidad del ensayo del IFN- γ se de-

terminó en una población de 6.000 bovinos provenientes de áreas libres de tuberculosis y fue de 96,3%. Los valores de sensibilidad para ambos ensayos se determinó en un grupo de 6.264 animales proveniente de rebaños que se sabía que estaban infectados con *M. bovis*, la sensibilidad para el ensayo de IFN- γ fue de 93,6% y de la prueba simple de tuberculina fue de 65,6% [22,23].

Cuando se evalúan dos o tres pruebas en conjunto, se obtienen valores de sensibilidad, especificidad y concordancia más bajos que, cuando se calcula cada prueba individualmente. Los valores discordantes aumentan considerablemente (TABLAS IV, V y VI).

Comparando los resultados obtenidos en la prueba de PPD-B con IFN- γ se observó que, el número de animales posi-

tivos a PPD-B difiere de los positivos a IFN- γ . Los animales positivos a ambas pruebas están por debajo del número de animales positivos a cada una de las pruebas de manera individual, FIG. 3.

Se ha demostrado que en una población de animales infectados, los individuos reactivos a la prueba de la tuberculina o el PPD no son precisamente los mismos positivos a la prueba de IFN- γ . Algunos animales pueden resultar positivos a las dos pruebas pero otros resultan positivos solamente a la reacción intradérmica o al IFN- γ [15, 16]. Esto explica el porqué, el PPD-B sólo no es capaz de detectar todos los animales infectados puesto que, el *M. bovis*, dependiendo de la cepa infectante o del estado de salud y la genética del animal, puede generar respuestas inmunitarias diversas que requieren de nuevas técnicas para su evaluación [16].

En el caso del PPD-B y ELISA-TBC, se repite lo observado en comparación con el IFN- γ , el número de animales positivos a ambas pruebas (PPD-B +/ ELISA-TBC) es inferior a los positivos a cada prueba de manera individual, FIG. 4.

Este resultado demuestra que, al igual que el caso del PPD y el IFN- γ , pudieran existir animales positivos a ELISA-TBC, negativos a PPD e IFN- γ , lo cual no ha sido reportado con anterioridad para bovinos infectados con *M. bovis*. Estos animales corresponderían a individuos no reaccionantes, desde el punto de vista celular, previamente reportados como anérgicos. En estudios realizados en humanos diagnosticados como tuberculosos, negativos al PPD y al IFN- γ , se observaron altas concentraciones de IL-4, citocina responsable de la producción de anticuerpos (patrón de respuesta humoral) [13]. La prueba de ELISA-TBC se diseñó para detectar aquellos animales enfermos que poseen una anérgia de tipo celular [11]. La mayoría de estos animales no responden a las pruebas del PPD ni IFN- γ . Este patrón de respuesta humoral se encuentra asociado generalmente con una progresión de la enfermedad hacia un cuadro de tuberculosis diseminada, lo cual representa un factor importante dentro de la cadena de infección [11, 23]. Según algunos reportes, la sensibilidad del ELISA-TBC es buena, llegando a estar en el mismo orden que la del IFN- γ [11].

TABLA IV
VALORES OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PPD-B + IFN- γ / VALUES OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE PPD-B + IFN- γ

PPD-B, IFN- γ	Infectados		Total
	+	-	
+	39	64	103
-	12	21	33
	51	85	136

Sensibilidad: 0,77 Especificidad: 0,24
Concordancia = 44% Discordancia= 55%

TABLA V
VALORES OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PPD-B+/ELISA-TBC+/ VALUES OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PPD-B/ELISA-TBC+

PPD-B, ELISA-TBC	Infectados		Total
	+	-	
+	41	70	111
-	10	15	25
	51	85	136

Sensibilidad: 0,81 Especificidad: 0,17
Concordancia = 41% Discordancia= 58%

TABLA VI
VALORES OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PPD-B+/IFN- γ +/ELISA-TBC+./ VALUES OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PPD-B+/IFN- γ +/ELISA-TBC+

PPD-B, IFN- γ ELISA-TBC	Infectados		Total
	+	-	
+	44	73	117
-	7	12	19
	51	85	136

Sensibilidad: 0,87 Especificidad: 0,14
Concordancia= 41% Discordancia =58%

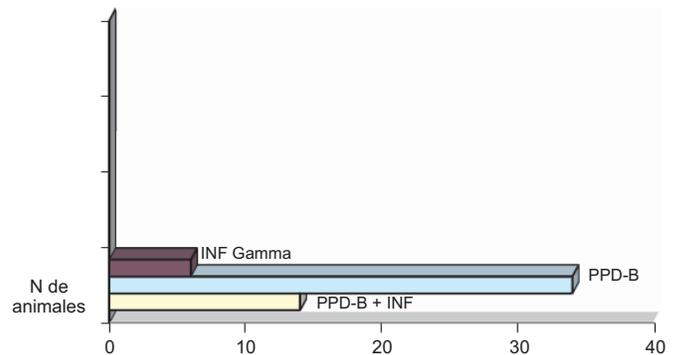


FIGURA 3. COMPARACIÓN GRÁFICA DEL RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PPD-B/IFN γ /VISUAL COMPARISON OF THE PPD-B/IFN- γ TEST.

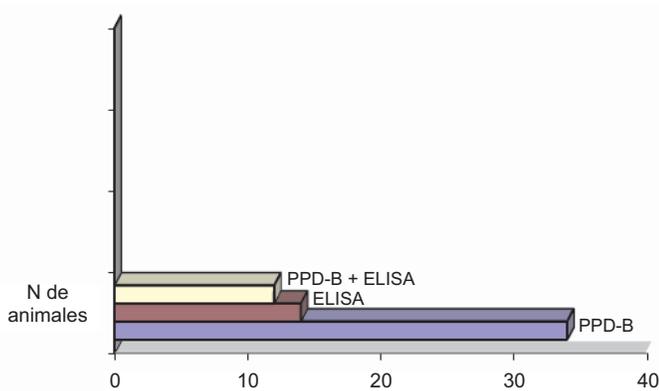


FIGURA 4. COMPARACIÓN GRÁFICA DEL RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE PPD-B/ELISA- TBC./ VISUAL COMPARISON OF THE PPD-B/ELISA- TBC TEST.

La dicotomía de la respuesta mediada por anticuerpos versus la respuesta mediada por células, en el ganado infectado con *M. bovis* se puso en evidencia durante los estudios de campo del ensayo del IFN- γ . La mayoría de los bovinos que dieron una respuesta positiva en una prueba de ELISA utilizando como antígeno MPB70, dieron una respuesta negativa en el ensayo del IFN- γ y a la prueba de tuberculina. En investigaciones realizadas con fines de comparar diversas pruebas de diagnóstico se encontraron resultados similares, al observarse una relación inversa entre una respuesta celular (IFN- γ) y una respuesta humoral (ELISA) al *M. bovis* en el ganado con una infección natural [11,16,17,23].

Evidentemente, existen en la tuberculosis bovina varios patrones de respuesta inmunitaria, cada uno de ellos caracterizados por respuestas exclusivamente celulares, humorales o mixtas, llegando hasta la no respuesta o anergia, lo cual pueden ser evidenciados por las pruebas diagnósticas que revelan, bien sea, una reacción de hipersensibilidad tipo IV, la producción de IFN- γ o la producción de anticuerpos TBC específicos, detectados por la prueba de ELISA, en forma separada o mixta, en todas sus combinaciones posibles.

Finalmente es importante señalar que, existe un grupo de animales positivos en cultivo y PCR a la tuberculosis bovina, que no reaccionan frente a ninguna de las otras pruebas diagnósticas realizadas durante este estudio, representando un 5,88% del total de la población evaluada. Este grupo fue clasificado como “anérgico”, desde el punto de vista inmunológico, incapaz de responder celular o humoralmente frente a la infección con el *M. bovis*. Estos animales representan un verdadero problema para el control y erradicación de la tuberculosis bovina, manteniendo la persistencia en el rebaño de animales infectados, transmisores de la enfermedad, imposible de ser detectados en vida por las pruebas diagnósticas de campo o de laboratorio. Estos animales podrían provenir de vacas infectadas (transmisión vertical) o ser producto de la infección de cepas patógenas capaces de evadir las respuestas inmunitarias características frente al *M. bovis*.

Otro grupo importante de animales (8,82%), descartados por el INSAI como positivos, reactivos a la prueba de tuberculina, resultaron negativos a todas las pruebas diagnósticas (PPD-B, IFN- γ y ELISA-TBC), incluyendo el cultivo y la PCR. Esto representa una gran pérdida para el sector ganadero la cual podría ser solventada incluyendo en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, la totalidad de las tres pruebas diagnósticas sugeridas en este estudio.

CONCLUSIONES

La prueba oficial de la tuberculina aplicada por el INSAI, detectó animales infectados con *M. avium*, PPD-A positivos PPD-B negativos, Igualmente detectó animales negativos, no infectados con *M. bovis*, evidenciados por el cultivo bacteriológico y la PCR en muestras tomadas en matadero.

La mayoría de animales que reaccionaron al PPD-B no son, en su totalidad, los mismos que reaccionaron al IFN- γ o al ELISA-TBC, reforzando la existencia de varios patrones de respuesta inmunitaria en animales infectados con *M. bovis*.

La mayor sensibilidad, especificidad y concordancia se obtuvo al utilizar la prueba diagnóstica PPD con el antígeno del *M. bovis*, con el menor porcentaje de datos discordantes. Estos parámetros recaen al utilizar dos o tres pruebas diagnósticas.

Existe un grupo de animales “anérgicos” que no reaccionan a ninguna de las tres pruebas diagnósticas, infectados con *M. bovis* (positivos en cultivo bacteriológico y PCR), los cuales corresponden, posiblemente, a hijos de vacas infectadas, no detectadas por las pruebas convencionales o infectados crónicos. Ambas condiciones pudieran estar presentes.

RECOMENDACIONES

Es posible que estas diferencias encontradas entre las pruebas diagnósticas correspondan a diferencias propias de cada una de las cepas de *M. bovis* que infectan al bovino en esta región para lo cual se requiere de estudios especializados en epidemiología molecular.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue realizado con recursos provenientes del laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina, Hospital Vargas, Caracas y del laboratorio de Zoonosis “Dr. Ángel Meléndez” del Decanato de Ciencias V Veterinarias de la UCLA, Cabudare, Edo. Lara, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BLOOD, D.I.; HENDERSON, J.A. Enfermedades Causadas por bacterias, **Medicina Veterinaria**. 6^{ta} Ed. Editorial Interamericana. México D. F. 691-701 pp. 2000.

- [2] BIET, F.; BOSCHIROLI, M.; THOREL, M. F.; GUILLOTEAU, L. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Vet. Res.** 36: 411 - 436. 2005.
- [3] BURRELLS, C.; INGLIS, N.F.; DAVIES, R.C.; SHARP, J.M. Detection of specific T Cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 45: 311-320. 1995.
- [4] COBOS, L.; MONTES, J.; RIVERA, S.; LICEA, A.; GONZALEZ, J.; ESTRADA, I. A Novel Multiplex- PCR for the Rapid Identification of *Mycobacterium bovis* in Clinical Isolates of Both Veterinary and Human Origin. **Epidemiol. Infect.** 130: 485-490. 2003.
- [5] CONTRERAS, J.A. Enfermedades causadas por bacterias, Tuberculosis, **Enfermedades de los Bovinos.** 2^{da} Ed. Editorial Bogue. Barquisimeto. 560-584 pp. 2000.
- [6] FRESNO, M.; KOPF, M.; RIVAS, L. Cytokines and infection disease. **Immunol. Today.** 18(2): 56-58. 1997.
- [7] GRIFFIN, J.F.T. Tuberculosis in domesticated Red Deer: Comparison of purified protein derivative and the specific protein MBP70 for in vitro diagnosis. **Res. in Vet Sci.** 50: 279-285. 1991.
- [8] HERNANDÉZ, P.; JEYANATHAN, M.; MENGISTU, G.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; HARBOE, M.; ROOK, G. A.; BJUNE, G. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. **Lancet.** 356: 2133-2138. 2000.
- [9] KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and the eradication programs. **Vet. Microbiol.** 40: 5-14. 1994.
- [10] LIEBANA, E.; ARANAZ, A.; DOMÍNGUEZ, L.; MATEOS, A.; LLAMAZARES, O.; FERR, E.; DOMINGO, M.; VIDAL, D.; COUSINS, D. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. **Vet. Microbiol.** 54: 223-233. 1997.
- [11] LILENBAUM, W.; RIBEIRO, E.R.; SOUZA, G.N.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L.S.; FERREIRA, M.A.; SCHETTINI, J.S. Evaluation of and ELISA – PPD for diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. **Res. in Vet. Sci.** 66: 191-195. 1999.
- [12] MEDEROS, L.; YZQUIERDO, S.; DIAZ, A.; EICHEMENDIA, M.; MONTORO, E. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la tuberculosis y otras micobacteriosis. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones e Tuberculosis y Mycobacterias. La Habana, Cuba. 124-212 pp. 1997.
- [13] MONTIEL, M.; RIVERA, S.; HERNÁNDEZ, R.; HASSANHI, M.; VARGAS, F.; NÚÑEZ, J. Respuesta Inmunitaria y Anérgia. Estudio en pacientes Tuberculosos del Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela. **Acta Cientif. Ven.** 53 (1): 36-43. 2002.
- [14] NADER, A. J.; HUSBERG, H. Estimated losses in bovine tuberculosis infected dairy farm. **Rev. Med. Vet.** 69 (1): 36-43. 1988.
- [15] NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet. Microbiol.** 40: 41-52. 1994.
- [16] POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D.; McNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease, **Vet. Immunol. Immunopathol.** 108: 37-43. 2005.
- [17] ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R. The gamma – interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: Conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. **Aust. Vet.** 69: 1-4. 1992.
- [18] SHIRAKAWA, T.; ENOMOTO, T.; SHIMAZU, S.; HOPKIN, J. The Inverse Association Between Tuberculin Response and Atopic Disorder. **Science.** 275: 77-79. 1997.
- [19] SREEVATSAN, S.; X. PAN, E.; STOCKBAUER, N.; CONNELL, B.; KREISWIRTH, T.; MUSSER, M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 9869-9874. 1997.
- [20] WEDLOCK, N.; ALDWELL, F.; COLLINS, D.; de LISLE, G.; WILSON, T.; BUDDLE, B. Immune Responses Induced in Cattle by Virulent and Attenuated *Mycobacterium bovis* Strains: Correlation of Delayed- Type Hypersensitivity with Ability of Strains To Grow in Macrophages. **Infect. and Immun.** 67: 2172-2177. 1999.
- [21] WHIPPLE, D.; BOLIN, C.; DAVIS, A.J.; JARNAGIN, J.L.; JOHNSON, D.C.; NABOR, R.S.; PAYEUR, J.B.; WILSON, A.; WOLF, M. Comparison of the sensitivity of caudal fold skin teste and a commercial -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** 56. (4): 415-419. 1995.
- [22] WOOD, P.R.; ROTHEL, J.S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. **Vet. Microbiol.** 40: 125-135. 1994.
- [23] WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; RIPPER, J.L.; FIFIS, T.; Mc CORMICK, B.S.; FRANCIS, B.R.; MELVILLE, L.; SMALL, K.; de WITTE, K.; TOLSON, J.; COX, J.C. A field evaluation of serological and cellular diagnosis test for bovine tuberculosis. **Vet. Microbiol.** 31: 71-79. 1992.