

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUCIÓN AL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN
POR "MYCOBACTERIUM BOVIS" EN EL GANADO CAPRINO**

BEGOÑA ACOSTA HERNÁNDEZ

Las Palmas de Gran Canaria, 1995

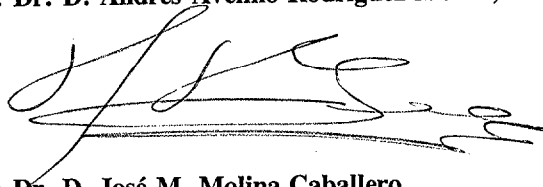
41/1994-95

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por la Doctoranda las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de "APTO CON LAUDE" POR UNANIMIDAD Las Palmas de G. C., a 23 de junio de 1995.

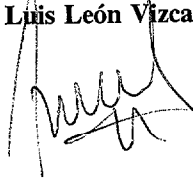
El Presidente: Dr. D. Andrés Avelino Rodríguez Moure,



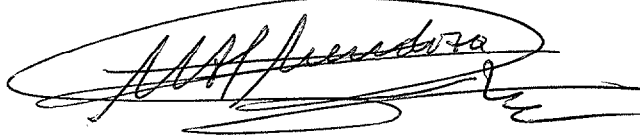
El Secretario: Dr. D. José M. Molina Caballero,



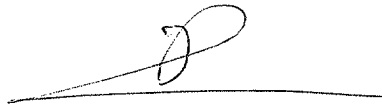
El Vocal: Dr. D. Luis León Vizcaino,



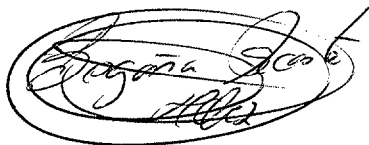
El Vocal: Dr. D. Miguel Hermoso de Mendoza,



El Vocal: Dr. D. Zoilo González Lama,



La Doctoranda: D^a Begoña Acosta Hernández,





BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
LAS PALMAS DE G. CANARIA	
N.º Documento	<u>403030</u>
N.º Copia	<u>403044</u>

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION
ANIMAL, BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR
Mycobacterium bovis EN EL GANADO CAPRINO**

**BEGOÑA ACOSTA HERNANDEZ
Las Palmas de Gran Canaria, 1995**

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

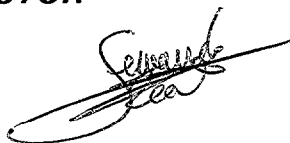
DOCTORADO EN VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION ANIMAL,
BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO DE LA INFECCION
POR *Mycobacterium bovis* EN EL GANADO CAPRINO**

**Tesis Doctoral presentada por la
Licenciada en Veterinaria
Begoña Acosta Hernández, para
optar al título de Doctora.
Las Palmas de G. C. a 2 de Mayo de 1995**

EL DIRECTOR



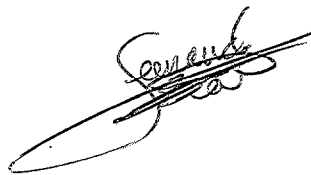
Fdo.: Dr. Fernando Real Valcárcel

LA DOCTORANDO

Don Fernando Real Valcarcel, profesor titular de "Enfermedades Infecciosas, Epidemiología, Medicina Preventiva y Policía Sanitaria" del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria y Director de la Tesis Doctoral titulada "CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR Mycobacterium bovis EN EL GANADO CAPRINO", de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Doña Begoña Acosta Hernandez,

INFORMA

que dicha memoria ha sido realizada por la mencionada Licenciada, bajo mi dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación y normativas vigentes para optar al Título de Doctora en Veterinaria.



Las Palmas de G. C., a 2 de Mayo de mil novecientos noventa y cinco.

A mi marido y a mis hijos (José Antonio y Lorenzo) por haberme comprendido y animado, y por las horas de menos que durante tantos años que les he dedicado. Y muy especialmente a mi madre, sin la que este trabajo no hubiera sido posible.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	
1.- IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS	6
1.1.- SINONIMIA Y CONCEPTO	6
1.2.- IMPORTANCIA	7
1.2.1.- IMPORTANCIA ECONOMICA	8
1.2.2.- IMPORTANCIA SANITARIA	7
1.2.2.1.- LA IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA ZONOSIS POR <i>M.bovis</i>	9
1.2.2.2.- LA IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA ZONOSIS POR <i>M.tuberculosis</i>	10
1.2.2.3.- LA IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA ZONOSIS POR <i>M.avium</i>	10
1.2.2.4.- LA IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA ZONOSIS POR OTRAS MICOBACTERIAS	11
1.3.- ESPECIES SENSIBLES	11
1.3.1.- ESPECIES SENSIBLES A <i>M.bovis</i>	11
1.3.2.- ESPECIES SENSIBLES A <i>M.tuberculosis</i>	12
1.3.3.- ESPECIES SENSIBLES A <i>M.avium</i>	12
1.3.4.- LA CABRA COMO ESPECIE SENSIBLE	12
1.4.- INCIDENCIA Y DISTRIBUCION	13
1.4.1.- DISTRIBUCION DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA	13
1.4.2.- DISTRIBUCION DE LA TUBERCULOSIS EN OTRAS ESPECIES	14
1.5.- LEGISLACION	14
1.5.1.- ESPAÑOLA	15
1.5.2.- CEE	15
2.- ETIOLOGIA	15
2.1.- GENERO Y ESPECIES	16
2.2.- MORFOLOGIA Y TINCION	18
2.2.1.- ULTRAESTRUCTURA	19
2.3.- NECESIDADES Y MEDIOS DE CULTIVOS	22
2.3.1.- MEDIOS DE CULTIVOS RECOMENDADOS PARA EL AISLAMIENTO DE <i>M.tuberculosis</i>	24
2.3.2.- MEDIOS RECOMENDADOS PARA EL AISLAMIENTO DE <i>M.bovis</i>	25
2.3.3.- OTROS MEDIOS DE CULTIVO	26

2.4.- RESISTENCIA A AGENTES FISICOS Y QUIMICOS	26
2.5.- ESTRUCTURA ANTIGENICA	27
2.6.- COMUNIDAD ANTIGENICA	32
3.- EPIDEMIOLOGIA.....	33
3.1.- EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA	33
3.1.1.- FACTORES DEPENDIENTES DEL HOSPEDADOR	33
3.1.2.- FACTORES DEPENDIENTES DEL AGENTE	37
3.1.3.- FACTORES DEPENDIENTES DEL MEDIO AMBIENTE ...	37
3.1.4.- FUENTES DE CONTAGIO Y VIAS DE CONTAGIO	38
4.- PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE DE LAS MICOACTERIOSIS	39
4.1.- DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD	40
4.2.- FASES PATOGENICAS DE LA TUBERCULOSIS	41
4.3.- DIFERENCIAS PATOGENICAS EN EL GANADO CAPRINO	47
5.- CLINICA.....	48
5.1.- CLINICA EN EL GANADO CAPRINO	48
5.2.- CLINICA DE LA ENFERMEDAD EN OTRAS ESPECIES ANIMALES	50
6.- LESIONES.....	51
6.1.- LESIONES EN GANADO CAPRINO	51
6.1.1.- LESIONES POR <i>M.bovis</i>	51
6.1.1.1.- MACROSCOPICAS	51
6.1.1.2.- MICROSCOPICAS	54
6.1.2.- LESIONES POR <i>M.avium</i>	56
6.1.3.- LESIONES POR <i>M.tuberculosis</i>	57
6.2.- LESIONES EN OTRAS ESPECIES	58
7.- DIAGNOSTICO.....	61
7.1.- CLINICO-LESIONAL	61
7.2.- LABORATORIAL	61
7.2.1.- HISTOPATOLOGICO	61
7.2.2.- MICROBIOLOGICO	63
7.2.2.1.- BACTERIOSCOPICO	63
7.2.2.2.- CULTIVOS CONVENCIONALES	63
7.2.2.3.- IDENTIFICACION	63
7.2.2.3.1.- BIOLOGICA	64
7.2.2.3.2.- TIPIFICACION DE MICOBACTERIAS POR REACCIONES QUIMICAS	65

7.2.2.3.3.- FAGOTIPIA	66
7.2.2.3.4.- CROMATOGRAFIA DE GASES, CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA	66
7.2.2.3.5.- METODOS DE DETECCION DE MICOBACTERIAS BASADOS EN EL ANALISIS DE LOS ACIDOS NUCLEICOS	67
7.2.2.3.6.- METODO E.L.I.S.A.	68
7.2.3.- MEDICION DE LA RESPUESTA INMUNE	69
7.2.3.1.- CELULAR	69
7.2.3.1.1.- INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA	69
7.2.3.1.2.- TRANSFORMACION LINFOBLASTICA	75
7.2.3.1.3.- Γ -INTERFERON BOVINO	75
7.2.3.2.- HUMORAL	77
7.2.3.2.1.- METODO E.L.I.S.A.	77
7.2.3.2.3.- INMUNOFUORESCENCIA	82
7.2.3.2.3.- OTRAS	83
7.3.- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA POR <i>M.bovis</i>	83
8.- LUCHA.	84
8.1.- TRATAMIENTO	84
8.2.- PROFILAXIS	85
8.2.1.- INMUNITARIA	85
8.2.2.- SANITARIA	86
8.3.- ERRADICACION	87
MATERIAL Y METODOS	
1.- OBJETIVOS.	90
2.- ANIMALES	91
2.1.- PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 1º.	92
2.2.- PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 2º.	93
2.3.- PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 3º.	94
3.- METODOS.	94
3.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS	94
3.1.1.- DESCONTAMINACION	95
3.1.2.- AISLAMIENTO	95
3.1.3.- IDENTIFICACION	96
3.1.3.1.- MORFOLOGICA	96
3.1.3.2.- BIOQUIMICA	96
3.1.3.2.1.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	96
3.1.3.2.2.- REDUCCION DE NITRATOS	97
3.1.3.2.3.- PRODUCCION DE CATALASA	97

3.1.3.2.4.- HIDROLISIS DEL TWEEN-80	98
3.1.3.2.5.- CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE TCH	98
3.1.3.2.6.- PRODUCCION DE NIACINA	98
3.2.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE	99
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
3.2.1.- AISLAMIENTO	100
3.2.2.- IDENTIFICACION	100
3.2.2.1.- MORFOLOGICA	100
3.2.2.2.- METODO BIOQUIMICO	100
3.2.2.3.- TECNICAS COMPLEMENTARIAS	101
3.2.2.3.1.- HEMOLISIS SINERGICA	101
3.2.2.3.2.- INHIBICION DE LA B-HEMOLISINA ESTAFILOCOCCICA.	101
3.3- DESARROLLO DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70	101
3.3.1.- COMPROBACION DEL NIVEL DE PUREZA DEL ANTIGENO MPB70	101
3.3.2.- TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70	103
3.3.2.1.- VARIABLES INVESTIGADAS PARA LA ESTANDARIZACION DE LA TECNICA	104
3.3.2.2.- TECNICA ESTANDARIZADA	104
3.4.- DESARROLLO DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO A60 . .	105
3.5.- CALCULO DEL ESTIMADOR KAPPA	108
3.6.- INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA COMPARATIVA .	110
3.7.-METODO DE MUESTREO PARA LOS SUEROS DE LAS ISLAS DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE	112
4.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVOS	114
4.1.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVOS EMPLEADOS EN TECNICAS MICROBIOLÓGICAS.	114
4.1.1.- SOLUCION DESCONTAMINANTE	114
4.1.1.1.- SOLUCION DE SOSA AL 1 %	114
4.1.1.2.- SOLUCION DE ÁCIDO SULFÚRICO	114
4.1.1.3.- AZUL DE BROMOTIMOL	114
4.1.2.- MEDIOS DE CULTIVOS	114
4.1.2.1.- PARA <i>Mycobacterium spp.</i>	114
4.1.2.2.- PARA <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	115
4.2.- TINCCIONES	115
4.3.- SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE LAS MICOBACTERIAS AISLADAS	115
4.3.1.- REACCION DE LA REDUCCION DE LOS NITRATOS . .	115
4.3.1.1.- BACTO NITRATE BROTH	115
4.3.1.2.- REACTIVO SULFANILICO	115
4.3.1.3.- REACTIVO ALFA NAFTILAMINA	115
4.3.2.- REACCION DE LA CATALASA	116
4.3.2.1.- SOLUCION AL 10 % DE TWEEN 80	116
4.3.2.3.- SOLUCION FOSFATO M/15 DE PH 7	116
4.3.3.- HIDROLISIS DEL TWEEN 80	116

4.4.- SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) DEL ANTIGENO DE <i>M.bovis</i> BCG	117
4.4.1.- SOLUCION MADRE DE ACRILAMIDA/BIS ACRILAMIDA	117
4.4.2.- SOLUCION DE SDS	117
4.4.3.- AMONIO PERSULFATO	117
4.4.4.- SOLUCION CONCENTRADORA	117
4.4.5.- SOLUCION RESERVORIO	118
4.4.6.- DISOLVENTE DE LA MUESTRA	118
4.4.7.- TINCION DE GELES	118
4.4.8.- DECOLORANTE	118
4.4.9.- GEL SEPARADOR	119
4.4.10.- GEL CONCENTRADOR	119
4.5.- TECNICA ELISA	119
4.5.2.- SOLUCIONES	119
4.5.2.1.- SOLUCIONES SALINAS	119
4.5.2.1.1.- TABLETAS PBS (SIGMA S.A.)	119
4.5.2.1.2.- PBS LAVADOR	120
4.5.2.1.3.- PBS FIJADOR DE ANTIGENO	120
4.5.2.1.4.- PBS PARA BLOQUEO Y DILUCIONES	120
4.5.2.2.- SOLUCION SUSTRATO	120
4.5.2.2.1.- PARA EL ANTIGENO MPB70	121
4.5.2.2.2.- PARA EL ANTIGENO A60	121
4.5.2.3.- SOLUCION DE PARADA	121
4.5.2.3.1.- PARA EL ANTIGENO MPB70	121
4.5.2.3.2.- PARA EL ANTIGENO A60	121
RESULTADOS	
1.- RESULTADOS PRELIMINARES	122
1.1- CONTROL DE PUREZA DEL ANTIGENO MPB70 EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)	122
1.2.-ESTANDARIZACION DEL METODO ELISA INDIRECTO CON ANTIGENO MPB70	125
1.3.- ESTANDARIZACION DEL CONJUGADO PARA EL ELISA INDIRECTO CON ANTIGENO A60	126
2.- RESPUESTA DEL GANADO CAPRINO EXENTO DE INFECCION POR <i>M.bovis</i>.	127
2.1.- A DISTINTAS PAUTAS DE INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA REPETIDA	127
2.2.- A LA TECNICA ELISA INDIRECTA CON ANTIGENO MPB70.	129
3.- RESPUESTA EN CABRAS CON UNA PRESUNTA INFECCION NATURAL POR <i>M.bovis</i>.	131
3.1.-INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA	131

3.2.-DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO	131
3.3.-DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO	132
3.4.-RESPUESTA HUMORAL FRENTE A LOS ANTIGENO MPB70 Y A60 LA TECNICA ELISA	133
4.-RESPUESTA DEL LOTE DE CABRAS CON UNA INFECCION NATURAL POR <i>C. pseudotuberculosis</i> EN ESTADO ACTIVO Y EXENTAS DE LA INFECCION POR <i>M.bovis</i>	134
4.1.- ESTABLECIMIENTO DEL ESTADO DE EXENCION DE LA INFECCION POR <i>M.bovis</i>	134
4.2.-HALLAZGOS CLINICOS	134
4.2.1.-RESULTADOS A LA INTRADERMO- RREACCION TUBERCULINICA DURANTE LA EXPERIENCIA	135
4.2.2.-RESULTADOS MICROBIOLOGICOS	136
4.2.2.1.-BACTERIOSCOPIA Y PRUEBAS BIOQUIMICAS Y COMPLEMENTARIAS	136
4.3.-RESPUESTA HUMORAL A LA TECNICA ELISA CON LOS ANTIGENOS MPB70 Y A60 DURANTE SUCESIVAS INOCULACIONES CON TUBERCULINA BOVINA Y AVIAR	137
5.-RESPUESTA HUMORAL A LA TECNICA ELISA CON LOS ANTIGENOS MPB70 Y A60 EN CABRAS INFECTADAS POR <i>Mycobacterium avium subesp paratuberculosis</i>	138
6.- RESULTADOS DEL ESTIMADOR KAPPA	139
6.1.-RESULTADOS DE KAPPA TOMANDO COMO TECNICA ESTANDAR LA INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA CON PPD BOVINO PARA COMPARAR LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA POR <i>M.bovis</i>	140
6.2.-RESULTADOS DE KAPPA TOMANDO COMO TECNICA ESTANDAR LA INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA CON PPD BOVINO PARA COMPARARLA TECNICA ELISA CON ANTIGENO A60 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA POR <i>M.bovis</i>	141
6.3.-RESULTADOS DE KAPPA TOMANDO COMO TECNICA ESTANDAR EL ELISA INDIRECTO CON MPB70 PARA COMPARARLA TECNICA ELISA CON ANTIGENO A60 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS POR <i>M.bovis</i>	142
7.-ESTUDIO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR <i>M.bovis</i> MEDIANTE ELISA INDIRECTO CON ANTIGENO MPB70 EN LA POBLACION CAPRINA DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE	143

7.1.-ESTUDIO SEROLOGICO EN LA ISLA DE GRAN CANARIA	143
7.2.-ESTUDIO SEROLOGICO EN LA ISLA DE LANZAROTE.	144
DISCUSION	
1.- UTILIDAD DE LOS ANTIGENOS MPB70 Y A60 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA POR <i>M.bovis</i> UTILIZANDO LA TECNICA ELISA	145
1.1.- FRENTE AL EMPLEO DEL ANTIGENO MPB70	145
1.2.- REFERENTE AL EMPLEO DEL ANTIGENO A60.	151
1.3.- NIVEL DE ACUERDO MOSTRADO POR AMBOS ANTIGENOS	152
2.- INFLUENCIA DE REALIZAR INTRADERMORREACCIONES TUBERCULINICAS SUCESIVAS EN GANADO CAPRINO UTILIZANDO LA TECNICA COMPARATIVA	155
2.1.- EN EL GRUPO DE CABRAS APARENTEMENTE SANAS.	156
2.2.- EN EL GRUPO DE CABRAS INFECTADAS CON <i>C.pseudotuberculosis</i>	160
3.- PREVALENCIA DE LA TUBERCULOSIS DEL GANADO CAPRINO DE LAS ISLAS DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE MEDIANTE UN ELISA CON ANTIGENO MPB70.	164
CONCLUSIONES.	167
RESUMEN.	169
SUMMARY.	171
BILIOGRAFIA.	173
AGRADECIMIENTOS.	202
ANEXOS	

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta al hombre, a los mamíferos domésticos y silvestres en estado de libertad o mantenidos en cautividad, a los pájaros y aves de compañía o renta, y a los peces (SCHLIESSER, 1973).

La tuberculosis humana fue descrita hace más de 2000 años, y las lesiones óseas halladas en momias egipcias prueban que atacaban al hombre desde la antigüedad (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). Sin embargo las referencias sobre tuberculosis animal son mucho más tardías, como lo muestra la descripción de tuberculosis pulmonar de los vacunos de Columela en el año 40, con mucho la más antigua (MATHIAS, 1981).

No obstante, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se describe el primer caso de tuberculosis humana por *M.bovis* (CORRÊA y CORRÊA, 1974).

La tuberculosis caprina ha sido considerada por ganaderos y veterinarios, como una enfermedad inexistente. El primer caso de tuberculosis caprina fue descrito por Koch en 1884, poniéndose en evidencia bacilos ácido resistentes en lesiones tuberculosas (FUENTES, 1987). Posteriormente han sido muchos los autores que la han descrito: VAN ES y SCHALK (1914), GRIFFITH (1928), PLUM (1935), FRANCIS (1958), LUKE (1958), todos cit. LESSLIE y cols. (1960); DAVENAS y DABRIGEON (1955), PERRIN y cols.. (1984), THOREL y GAUMONT (1977), THOREL (1980, 1984). La especie de micobacteria más frecuentemente responsable de tuberculosis caprina es *M.bovis* (LITTLE, 1924, cit. LUKE 1958; MILNE, 1955; BERNABE y cols., 1990-91; GOMEZ y cols., 1992; ACOSTA y cols., 1993). Pero con menor frecuencia se han descrito infecciones por otras especies de micobacterias con la aparición de lesiones evidentes que han dado positivos a los métodos clásicos de diagnóstico mediante intradermorreacción tuberculínica, entre las que hay que citar *M.tuberculosis* (SOLIMAN y cols., 1953; VERA y cols., 1989), *M.kansasii* (ACOSTA y cols., 1993).

A tenor de los resultados obtenidos por distintos autores, es una de las enfermedades más importantes del ganado caprino asociada en la mayoría de los casos con otras enfermedades como paratuberculosis (NAVARRO y cols., 1990; BERNABE y cols., 1991; GOMEZ y cols., 1992), pseudotuberculosis y neumonías verminosas

(BERNABE y cols., 1990 A-B).

Y considerando los aspectos anteriormente citados justificamos las citas de nuestra revisión no sólo en el ganado caprino sino también en otras especies animales, y , aunque centrada en la infección por *M.bovis*, no podemos igualmente desconsiderar otras especies de micobacterias.

El diagnóstico de las micobacteriosis se realiza normalmente mediante técnicas biológicas o con la intradermorreacción tuberculínica. Si bien la primera de ellas es una técnica segura pero lenta, la intradermorreacción tuberculínica es una técnica rápida, con gran sensibilidad pero escasa especificidad (FRANCIS y cols., 1978). Para algunos autores la especificidad es del 61.1 % y la sensibilidad de un 80 % (STUART, 1988), J.FRANK y cols. (1989) citan una sensibilidad del 95 %, aunque se producen reacciones cruzadas con otras especies de micobacterias y otros actinomicetales, lo que da unos bajos niveles de especificidad. En muchos casos se ha demostrado que una de las posibles causas de resultado falso positivo a esta técnica en ganado bovino es la aplicación sistemática de tuberculina sin mantener un período mínimo de intertuerculinización. Igualmente la infección de *Actinomicetales* diferentes a *M.bovis* puede inducir una respuesta positiva (CAMERON, 1982)

Es la falta de especificidad de esta última técnica y la lentitud de los métodos bioquímicos, lo que ha llevado en los últimos años a la realización de ensayos con distintas técnicas, entre ellas el y interferón (WOOD y cols., 1991; BILLMAN-JACOBÉ y cols., 1992) y la técnica ELISA la cual se ha trabajado con una gran variedad de antígenos y anticuerpos monoclonales y policlonales micobacterianos, en busca de un aumento de especificidad en el diagnóstico de la tuberculosis sin detrimento de la sensibilidad. V. RITACCO y cols. (1990) evalúan la utilización de la técnica de ELISA indirecto en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, y observan que aunque con una adecuada especificidad (94.1 %) , adolece de sensibilidad (73,6 %).

Así se han utilizado distintos antígenos de *M.bovis* y *M.tuberculosis* en el diagnóstico de la tuberculosis humana y animal (FLAMAND y cols., 1994; FIFIS y cols., 1991 y 1989; WOOD y cols., 1989 y 1988; CHANDRAMUKI y cols., 1989 RADDIFORD y cols., 1988; MCFADDEN y HOWDAYER, 1988; COCITO y cols., 1987; WIKER y cols., 1986; COCITO y VALINDEN, 1986).

El antígeno MPB70 fue por primera vez descrito por S. NAGAI y cols. (1981), como una proteína purificada obtenida de *M. bovis* BCG (Tokio 172). Se describe como estrictamente específica de *M. bovis*, es una proteína estable, pero cuando es mantenida a 95°C durante 30 minutos a Ph 5-7,5 u 8,7 algunos de sus productos se degradan. Su peso molecular obtenido por sedimentación es de 15000, por electroforesis es de 18000. Este antígeno se encuentra en otras subcepas de *M. bovis* BCG pero en menor concentración que en la Tokio (HARBOE y NAGAI, 1984). Es de naturaleza proteica, de 22 Kilodaltons, obtenido mediante cultivo y filtración de *M. bovis* cepa Tokio.

La especificidad del MPB70 es superior a la detectada utilizando como antígeno un filtrado crudo de *M. bovis*, observándose un menor porcentaje de falsos positivos. Este antígeno muestra una fuerte respuesta celular, tanto *in vivo* como *in-vitro* (FIFIS y cols., 1989). Es el principal antígeno de las cepas vacunales de BCG y *M. bovis* virulentas. Por lo cual, al ser utilizado como antígeno de diagnóstico no diferencia entre cepas vacunales y cepas virulentas (RADFORD y cols., 1988).

Estudiando infecciones inducidas artificialmente por *M. bovis*, *M. avium* e infecciones naturales por *M. avium* subesp. *paratuberculosis* o *C. pseudotuberculosis* en ganado bovino M. HARBOE y cols. (1990) han demostrado que MPB70 es extraordinariamente útil para detectar la infección por *M. bovis*, comportándose como un antígeno altamente específico.

Pero jamás ha sido probado este antígeno para evaluar las posibilidades de detección de la infección natural por *M. bovis*. El curso de una infección natural puede ser muy distinto al que se produce en las infecciones artificialmente inducidas (CAMERON y cols., 1971).

De otra parte es justo reconocer que trabajar con lotes de animales infectados naturalmente por distintas especies de actinomicetales como hemos realizado en esta tesis supone mayores dificultades en el desarrollo de una investigación pues exige un azar favorable a la hora de diagnosticar un brote y realizar su seguimiento en condiciones de campo y mediante técnicas de diagnóstico de adecuada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, este planteamiento tiene la ventaja de que los resultados y conclusiones que de él derivan ofrecen mayor aplicabilidad que otros métodos por cuanto responden a condiciones "reales" del seguimiento de la

evolución de una infección.

El antígeno A60 de *M. bovis* (BCG) (FADDA y cols., 1992), y *M. tuberculosis* (HUBBARD, 1992), es un antígeno macromolecular, termoestable, que se encuentra en la tuberculina vieja y PPD y ha sido purificado del citoplasma de *M. bovis* BCG (COCITO y VANLINDEN, 1986). A60 es un inmunógeno poderoso, induciendo y desarrollando reacción de hipersensibilidad (COCITO y cols., 1987). Es utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis humana (CHARPIN y cols., 1990), siendo efectivo también en la detección de anticuerpos en pacientes bajo tratamiento cuyo cultivo es negativo, detectando niveles de anticuerpos solamente en un 45 % de estos individuos (FADDA y cols., 1992). En los últimos años ha sido muy reiterada sus aplicaciones en medicina humana.

Este trabajo pretende:

- OBJETIVO 1.-

- Comprobar la utilidad del antígeno MPB70 en el diagnóstico de la tuberculosis caprina producida por *Mycobacterium bovis*, mediante la técnica ELISA indirecta, tratando para ello con sueros de animales infectados de forma natural con *M. bovis*, *M. avium* subesp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*.

- Contrastar los resultados obtenidos en el paso anterior con los que resultarían de otro ELISA utilizando los mismos sueros pero enfrentándolos al antígeno A60 de *M. bovis* cepa BCG.

- OBJETIVO 2.-

- Estudiar cómo influyen las sucesivas tuberculinizaciones con PPD bovina y PPD aviar en la producción de falsos positivos en ganado caprino aparentemente sanos, mediante la intradermorreacción tuberculínica comparativa, y contrastar dichos resultados con la respuesta humoral que estas cabras muestran mediante la técnica ELISA con MPB70 antes de cada tuberculinización.

- Estudiar cómo influyen las sucesivas tuberculinizaciones con PPD bovina y PPD aviar en la producción de falsos positivos en ganado caprino con lesiones evidentes y activas de seudotuberculosis, mediante la intradermorreacción tuberculínica comparativa y contrastar estos resultados con la respuesta humoral que estas cabras muestran mediante la técnica ELISA utilizando antígeno

MPB70.

- OBJETIVO 3.-

- Medir la prevalencia de la tuberculosis del ganado caprino de las Islas de Gran Canaria y Lanzarote mediante un ELISA con antígeno MPB70.

REVISION BIBLIOGRAFICA

1.- IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS

1.1.- SINONIMIA Y CONCEPTO

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta al hombre y a los mamíferos domésticos y silvestres en estado de libertad o mantenidos en cautividad, a los pájaros y aves de compañía o renta, y a los peces (SCHLIESSER, 1973).

La tuberculosis caprina, producida por *M. bovis* se caracteriza al igual que en el vacuno, por ser una enfermedad de curso lento y progresivo (LUKE, 1958; ALLEN y cols., 1987; EDINGTON, 1989). La tuberculosis en cabra es una importante enfermedad zoonótica ya que puede contagiar a las personas bien por manejo o por consumo de su carne (SHARAN y cols., 1988), o leche (JOUBERT, 1973).

Los síntomas más significativos y no patognomónicos consisten en una pequeña pérdida de la producción de leche pero persistente y en un adelgazamiento progresivo con pérdida del apetito que conduce a una caquexia acentuada y a la muerte. Existe suspensión del crecimiento de los animales jóvenes. (FUENTES, 1987). El principal agente etiológico en la especie caprina es *Mycobacterium bovis*.

Como es natural, tanto en la antigüedad como en la edad media hubo gran confusión con otras enfermedades, confusión que persistió hasta la segunda mitad del siglo XIX. (GILLESPIE y TIMONEY, 1983)

Los términos anglosajones por los que se ha conocido a esta enfermedad y sus lesiones son: wens, clivers, grape disease, pearl disease, wasters, piners, snorters, scrofula (adenitis cervical tuberculosa), muchas de ellas son más bien manifestaciones de la enfermedad (GRANGE y COLLINS, 1987).

No obstante, en la actualidad todos los autores coinciden en denominarla "tuberculosis".

1.2.- IMPORTANCIA

La tuberculosis animal por *M. bovis* es una de las enfermedades más importantes del ganado vacuno presente desde los tiempos más remotos de su domesticación. Es una enfermedad que actualmente guarda una estrecha relación con el desarrollo intensivo de la cría industrial.

Asistimos a un renacer de la tuberculosis en la población humana (CAMINERO, 1992). Teniendo en cuenta que el hombre se puede ver afectado por *M. bovis*, esta enfermedad se ha convertido en una de las más importantes dentro de los planteamientos de lucha y control. Ello significa que estamos ante una enfermedad con grandes repercusiones económicas y sanitarias.

1.2.1.- Importancia económica

El quebranto económico que ocasiona la tuberculosis bovina es, sin duda, la razón de más peso que ha obligado a los países que la padecen, o padecían, a organizar campañas para su erradicación (SAMANIEGO, 1973).

La importancia de la tuberculosis en ganado caprino estriba en la disminución gradual de la vida media de producción de los animales infectados, haciendo cada vez más frecuente y necesaria la eliminación de animales cada vez más jóvenes, si se efectúa la tuberculinización con frecuencia para su control y erradicación. Además, la disminución de la producción láctea y el adelgazamiento restringen el valor individual de los animales enfermos. (FUENTES, 1987). Esta enfermedad, causa una serie de problemas en los programas de control y erradicación, existiendo por una parte un efecto económico, muerte de cabras que necesariamente han de ser sacrificadas en mataderos, y costes a la hora de expedir certificados de origen de los animales (EDINGTON, 1989).

A principio de siglo, en Francia, en los mataderos de St^e. Etienne, la tuberculosis caprina, representaba el 0.17 % de los decomisos, en Alemania ocupaba el tercer lugar (0.72 %) después de los bovinos y los cerdos, mientras que en USA se señalaba solo un caso sobre 46000 cabras sacrificadas (BILLON 1944).

La tuberculosis caprina es hoy día una de las enfermedades

más importantes del ganado caprino en la región de Murcia, que ha pasado prácticamente desapercibida, ignorada o confundida con otros procesos infecciosos o parasitarios frecuentes de la cabra (BERNABE y cols., 1990-91(A); PERRIN y cols., 1984)

Los principales factores a tener en cuenta al valorar las pérdidas por tuberculosis son los siguientes:

-Pérdidas de carne: bien por decomisos o por menor rendimiento en carne, en este último las pérdidas pueden llegar a 15 Kg de carne neta por bovino tuberculoso.

-Pérdidas en leche: se estima que las vacas enfermas rinden de un 10 a un 25 % menos de leche.

-Por acortamiento de la vida del animal: la tuberculosis acorta la vida del animal en un 10-20 %.

-Otras pérdidas y trastornos: menor rendimiento al trabajo, esterilidad en casos de tuberculosis genital, etc (SAMANIEGO, 1973).

A.M. BERGA (1988), estimó las pérdidas directas e indirectas ocasionadas por la tuberculosis bovina y caprina en España en 1983. El mayor porcentaje (62 %) correspondía al descenso del número de crías, seguido por las indemnizaciones por sacrificio y la reducción en la producción láctea. Las cifras estimadas en estos tres conceptos para el ganado bovino son:

- pérdidas de cría: 3.223.058.000pts.
- indemnizaciones: 1.342.025.490 pts.
- pérdidas de leche: 982.686.654 pts.

1.2.2.- Importancia sanitaria

La tuberculosis es una enfermedad de las más antiguas de las que se tiene noticias y afecta a todos los animales domésticos, algunos salvajes y al hombre, siendo por este motivo un gran peligro para la salud pública (FUENTES, 1987).

La importancia zoonósica de la tuberculosis varía según la especie de micobacteria responsable (BENET 1990).

1.2.2.1.- La importancia epidemiológica de la zoonosis por *M.bovis*

Esta zoonosis ha disminuido considerablemente en países de economía desarrollada. El éxito es atribuible directamente a la pasteurización de la leche y a la eliminación de la tuberculosis del ganado vacuno (BENET, 1990). Prueba de ello es que las campañas de erradicación de la tuberculosis bovina han conllevado a una reducción de los casos de tuberculosis humana, limitándose estos a personas de edad que estuvieron expuestas al agente durante su infancia y juventud (FARINA y cols., 1988).

Los países anglosajones estuvieron a la cabeza en cuanto a infecciones digestivas por la costumbre de ingerir leche cruda, en la que las vacas aparentemente sanas eliminan abundantes micobacterias (BATISH y cols., 1989). La práctica de la pasteurización ha hecho que la incidencia vaya bajando y haya quedado limitada a la población de edad avanzada. No obstante si la prevalencia de la tuberculosis bovina es elevada, la infección humana persiste como consecuencia de la preparación de cremas, mantequilla y queso con leche cruda (ACHA y SZYFRES, 1986).

La zoonosis por *M.bovis* no constituye actualmente un problema de salud pública. La aplicación de simples medidas de higiene pueden ser suficientes para prevenirlas (BENET, 1990).

En otro tiempo la prevalencia de la tuberculosis humana por *M.bovis* era de un 30 p.100 sobre todo en niños, pero actualmente su constatación es excepcional, aunque no todos los casos se someten a un diagnóstico bacteriológico preciso. La población rural es la más expuesta, pero el riesgo de infección humana con *M.bovis* es débil siendo del orden del 1 p.100 o menos (BENET 1990).

Esta zoonosis se convierte en una enfermedad que se incrementa en grupos de riesgo ocupacionales: criadores de ganado, obreros de zonas rurales, trabajadores de mataderos y laboratorios y veterinarios, en los cuales la principal vía de contagio es la aerógena (BARRERA y KANTOR, 1987; COLLINS, 1982; ROBINSON y cols., 1988)

La OMS calcula la tasa de tuberculosis humana causada por *M.bovis* en un 10 p.100 (CORRÊA y CORRÊA, 1974).

En España según datos recogidos del boletín del INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (1990), la incidencia de *M.bovis* en el hombre es la siguiente: 1983, ningún caso; 1984, 4 casos; 1985, 4 casos; 1986, 8 casos; 1987, 1 caso; 1988, ningún caso; 1989, 3 casos).

G. PERRIN y cols.(1984) sugieren que las cabras infectadas por *M.bovis* pueden ser una fuente de infección para el ganado y el hombre.

Según experiencias realizadas en Holanda y Dinamarca, se puede calcular que deben transcurrir de quince a veinte años después del saneamiento de la población bovina para que se pueda considerar extinguida la tuberculosis bovina del hombre (MEISSNER, 1973).

1.2.2.2.- La importancia epidemiológica de la zoonosis por *M.tuberculosis*

El hombre es el principal reservorio pero puede existir un contagio del hombre a los animales domésticos y viceversa (BENET, 1990). Se está iniciando una epidemia de tuberculosis humana a nivel mundial, debido a la pandemia de sida y a la aparición de bacilos tuberculosos resistentes a la antibioterapia en poblaciones hacinadas. Es decir, en muchos países en vías de desarrollo, en prisiones y en instituciones de acogida de mendigos en los EEUU. Al ser portador de una micobacteria resistente a la antibioterapia el paciente tiene capacidad infectante durante meses o incluso años, mientras que los microorganismos sensibles a fármacos son eliminados de forma relativamente rápida tras el inicio del tratamiento (DANNENBERG, 1993).

La cabra presenta mamitis por bacilos tuberculosos de esta especie, sumamente peligrosos para el consumidor de leche o queso fresco (Joubert, 1973).

1.2.2.3.- La importancia epidemiológica de la zoonosis por *M.avium*

También constituye una zoonosis aunque es raro que el hombre se vea afectado por ella (BENET, 1990).

1.2.2.4.- La importancia epidemiológica de la zoonosis por otras micobacterias

Constituyen también zoonosis, infecciones producidas por otras micobacterias tales como *M.kansasii*, *M.xenopi*, *M.malmoense*, *M.fortuitum*, *M.marinum*, *M.gordoniae*, aunque actualmente las zoonosis debidas a *M.kansasii*, *M.gordoniae*, *M.fortuitum* no constituyen problemas muy serios para salud pública (BENET, 1990). Algunas de las especies citadas como *M.marinum*, *M.chelonae* y *M.fortuitum* han sido aisladas a partir de lesiones de peces marinos (DULIN, 1979; LANSDELL y cols., 1993). *M.marinum* produce tuberculosis en peces de acuario y marinos. En el hombre produce lesiones granulomatosas en piel y se denomina enfermedad de las piscinas (DU MOULIN y STOTTMEIER, 1986; WAYNE y KUBICA, 1986). *M.chelonae* produce en el hombre alteraciones en tejido sinovial de la rodilla y lesiones similares a abscesos en la región glútea. *M.fortuitum* ha podido ser aislado de distintas afecciones del hombre: abscesos locales, enfermedades respiratorias, endocarditis, meningitis entre otras (DU MOULIN y STOTTMEIER, 1986; WAYNE y KUBICA, 1986). Algunas especies de micobacterias aisladas de lesiones en el hombre han podido aislarse de los sistemas de distribución del agua de suministro (DU MOULIN y STOTTMEIER, 1986).

M.leprae podría estar en camino de ser reconocida como una zoonosis, ya que puede transmitirse experimentalmente al armadillo, y naturalmente se ha observado en USA una enfermedad que provocó lesiones idénticas a las de la lepra humana en un armadillo y del cual se aisló una micobacteria indistinguible de *M.leprae* (BENET, 1990).

1.3.- ESPECIES SENSIBLES

1.3.1.- Especies sensibles a *M.bovis*

La bibliografía cita al ganado vacuno (THOEN y cols., 1979;

RODRÍGUEZ y cols., 1983; WEBER y cols., 1989; GRANGE y cols., 1990), visón (ROYAL COMISSION ON TUBERCULOSIS, 1911 cit. LUKE, 1958; HEIJLICEK y cols., 1973; THOEN y cols., 1984), ciervo (ROYAL COMISSION ON TUBERCULOSIS, 1911 cit. LUKE, 1958; THOEN y cols., 1984; FLEETWOOD y cols., 1988; STUART, 1988; FRANK y cols., 1989; ROBINSON y cols., 1989; GRANGE y cols., 1990; FANNING y EDWARDS, 1991) alce (THOEN y cols., 1984; FANNING y EDWARDS 1991), oveja (M'FADYEAN, 1900; CARMICHAEL, 1937; CREECH, 1940 todos cit. LUKE, 1958 y THOEN y cols., 1984), hombre (CORRÉA y CORRÉA, 1974; KUBIN y cols., 1984; THOEN y cols., 1984; BENET, 1990; FANNING y EDWARDS 1991), camello, mono, perro, gato, (THOEN y cols., 1984), caballo (M'FADYEAN, 1924, STABLEFORTH, 1929, GLOVER, 1949; todos cit. LUKE, 1958), cerdo (CORNER y cols., 1981; ROYAL COMISSION ON TUBERCULOSIS, 1911 cit. LUKE, 1958; THOEN y cols., 1984 12TH CONFERENCE, 1987; TAPPARELLI y MARZADORI, 1990), tejón (THOEN y cols., 1984; BENHAM y BROOM 1989; GRANGE y cols., 1990).

1.3.2.- Especies sensibles a *M. tuberculosis*

Podemos citar el caballo (GRIFFITH, 1937, cit. LUKE, 1958), cerdo (ROYAL COMISSION ON TUBERCULOSIS, 1911 y COBBETT, 1922, AMBOS cit. LUKE, 1958), oveja (VAN ES, 1925 cit. LUKE, 1958), entre otros.

1.3.3.- Especies sensibles a *M. avium*

Se incluye el caballo (M'FADYEAN, 1918 y WERDELIN, 1925; AMBOS cit. LUKE, 1958; BUERGELT y cols., 1988; ANZAI y cols., 1989; SILLS y cols., 1990); cerdo (VAN ES , 1925 y ROYAL COMISION, 1911, BANG, 1913, KLIMMER, 1930, PALLASKE, 1931 TODOS ELLOS cit. LUKE, 1958), oveja (GRIFFITH, 1925; CREECH, 1940; HARSHFIELD y RODERICK (1934), TODOS ELLOS cit. LUKE, 1958); vacuno (THOEN y cols., 1979; THOEN y cols., 1981; WEBER y cols., 1988; ALFREDSSEN cols., 1990) y ciervo (STUART, 1988; FRANK y cols., 1989; ROBINSON y cols, 1989).

1.3.4.- La cabra como especie sensible:

El principal agente etiológico responsable de la tuberculosis caprina es *M.bovis* (LITTLE, 1924, IYER, 1932, CARMICHAEL, 1937, MOHAN 1950, TODOS ELLOS cit. LUKE, 1958; MILNE, 1955; DAVENAS y DABRIGEON, 1955; SCHLIESSER, 1973; ALLEN y cols., 1987; BEER, 1987; PERRIN, 1984) GILESPIE y TIMONEY, 1983; DE LA HAYE, 1987; FUENTES, 1987; BERNABE y cols., 1990-91 (A-B); BERNABE y cols., 1991; ACOSTA y cols., 1993), aunque también se describen algunos casos producidos por *M.avium* (LUKE, 1958, SOLIMAN y cols., 1953; LESSLIE y cols., 1960; SCHLIESSER, 1973; GILESPIE y TIMONEY, 1983; VIALIER y cols., 1983; SHARMAN y cols., 1985; BEER, 1987; FUENTES, 1987; EDINGTON, 1989 y ANDERSEN y KING, 1993), tan solo algún caso aislado por *M.tuberculosis* (SOLIMAN y cols., 1953; SHARMAN y cols. 1985; ALLEN y cols., 1987; VERA y cols., 1989) y *M.kansasii* (ACOSTA y cols., 1993).

1.4.- INCIDENCIA Y DISTRIBUCION

1.4.1.- Distribución de la tuberculosis caprina

La tuberculosis caprina es una enfermedad ampliamente extendida por distintos puntos del planeta: Australia (MINISTRY OF AGRICULTURE, 1987; ALLEN y cols., 1987; COUSINS y cols., 1993), Francia (MILNE, 1955; DAVENAS y DABRIGEON, 1955; LESSLIE y cols., 1960; VIALIER y cols., 1983; PERRIN y cols., 1984); Inglaterra (SOLIMAN y cols., 1953; EDINGTON, 1989), USA (PLUM, 1935 cit. LUKE 1958), Uganda (CARMICHAEL, 1937), Tanganika (MILNE, 1955), Nigeria (ALAKU y MORUPPA, 1993), Alemania (STEIGLER, 1985 y 1986; BOROWKA, 1987; RUPPERT, 1992), Taiwan (LU y cols. 1992); Zambia (SHARMAN, 1985).

En nuestro país no se tuvo conocimiento de la existencia de la misma hasta 1987. A partir de entonces ha sido descrita en distintos puntos de nuestra geografía en las provincias de: Toledo por *M.bovis* y *M.avium* (FUENTES, 1987), Burgos por *M.bovis* (FUENTES, 1987), Murcia por *M.bovis* (BERNABE y cols., 1990-91 (A-B); BERNABE y cols., 1991) y algún caso aislado por *M.tuberculosis* (VERA y cols., 1989), Navarra debida a *M.bovis* (RODRIGUEZ y cols., 1989), y Canarias debida a *M.bovis* salvo algún caso aislado por *M.kansasii* (ACOSTA y cols., 1993).

1.4.2.- Distribución de la tuberculosis en otras especies

La enfermedad se ha descrito en la República de Irlanda (GRANGE y cols., 1990); Noruega (ALFREDSEN y cols., 1990); República Federal Alemana (WEBER y cols., 1988; PITTLER y BATZA, 1988); Portugal (DUFOUR, 1988); Italia (DUFOUR 1989); Francia (BENETT, 1989); España (RODRIGUEZ y cols., 1983; GOMEZ y cols., 1987); Canadá (FANNING y EDWARDS, 1991); Puerto Rico (THOEN y cols., 1979); Argentina (KANTOR y cols., 1987); Reino Unido (STUART, 1988); Australia (ROBINSON y cols., 1989); Nueva Zelanda (FRANK y cols., 1989).

Desde hace varios años se vienen realizando campañas de saneamiento ganadero en nuestro país y resto de países de la CEE, con el fin de conseguir su erradicación (RODRIGUEZ y cols., 1989).

Casi todos los países adelantados han conseguido eliminarla (Dinamarca, Holanda, Suecia, EEUU), y otros muchos están camino de conseguirlo, gracias a racionales campañas de erradicación (MEISSNER, 1973).

Así, en 1980 fueron saneadas en nuestro país 22.850 establos bovinos, correspondientes a 360.073 cabezas. El porcentaje de positividad fue del 6,10 % (ALVAREZ y cols., 1981). España está en camino de conseguir la erradicación de esta enfermedad. No obstante, pese a que estas campañas se entran distribuidas por toda España, lo que ha supuesto desde su puesta en marcha un considerable descenso en su prevalencia, el problema sigue estando presente. Dado que la lucha ha ido dirigida al ganado lechero, es actualmente el ganado de carne un reservorio importante de la bacteria, lo que ha llevado recientemente a su inclusión en los programas de erradicación (MEISSNER, 1973).

1.5.- LEGISLACION

La normativa que rige las actuaciones legales sobre esta enfermedad internacional queda recogida en la normativa nacional e internacional.

1.5.1.- Española

- Reglamento de epizootias (1955)
- Reglamento para prevenir la transmisión al hombre de las enfermedades epizooticas (1917).
- Orden del 25 de noviembre de 1978
- Orden del 28 de febrero de 1986
- Orden del 9 de febrero de 1990
- Real Decreto 434/1990 (1990)
- Real Decreto 495/1990

1.5.2.- Comunidad Económica Europea

- Directiva 64/432 (1964)
- Directiva del Consejo del 13 de Diciembre 1977

2.- ETIOLOGIA

En la actual edición del Manual Bergey (WAYNE y KUBICA, 1986), las especies del Género *Mycobacterium* se agrupan en la Sección 16 "las micobacterias", y dentro de esta en la Familia *Mycobacteriaceae*. Estas especies se diferencian de otros géneros afines, como *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, por su morfología (bacilar, ocasionalmente filamentosa y ramificada, generalmente sin micelio aéreo), su crecimiento más lento (entre 2 y 40 días), su mayor ácido resistencia, su menor capacidad de tinción por Gram y su resistencia a la penicilina (salvo, por ejemplo, en *M.avium*).

Aunque *Mycobacterium* se considera único miembro de la familia *Mycobacteriaceae*, en esta última edición del Manual Bergey se menciona una tendencia a agrupar los géneros productores de ácidos micólicos en una misma familia, apoyándose además en los

similares % de moles de G + C en el ADN de los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Tal tendencia aún no se ha hecho firme. De tal forma que a veces se denomina grupo CNM, al cual se debería adicionar el género *Rhodococcus* (WAYNE y KUBICA, 1986).

2.1.-GENERO Y ESPECIES

Los agentes responsables de la tuberculosis, pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, Género *Mycobacterium*, único representante de la familia (WAYNE y KUBICA, 1986 y HERNANDEZ y DUBON, 1992).

Dentro del género *Mycobacterium*, se han realizado diversas clasificaciones fundamentadas en afinidades evidentes observables entre especies. Se han utilizado entre otras clasificaciones basadas en la actividad amidasa (BÖNICHKE, 1962), en una combinación de fuentes de carbono y características biológicas (BOJALIL y cols., 1962). La más comúnmente aceptada es la clasificación basada en la velocidad de crecimiento y formación de pigmento en medio sólido de RUNYON y cols. (1974)

CLASIFICACIÓN DE RUYON (1974)		
GRUPO	PIGMENTACION	CRECIMIENTO
I Fotocromógenas	Amarillo naranja a la luz	Lenta
II Escotocromógenas	Amarillo naranja a la oscuridad	Lenta
III No cromogénicas	Color ante	Lenta
IV Crecimiento rápido	No pigmentadas	Rápida

El Género contiene especies que crecen rápidamente (7 días) y especies que crecen con lentitud (2 a 6 semanas), así como especies que no pueden desarrollarse *in vitro* (GILLESPIE y TIMONEY, 1983).

COMPLEJOS DE ESPECIES DENTRO DEL GENERO MYCOBACTERIUM (Melero, 1987)	
De crecimiento rápido (+ de 7 días)	De crecimiento lento (- de 7 días)
Complejo <u>M. fortuitum</u> <u>M. fortuitum</u> <u>M. fortuitum subesp. chelonae</u> <u>M. chelonae subesp. abscessus</u>	Complejo <u>M. tuberculosis</u> <u>M. tuberculosis</u> <u>M. bovis</u> <u>M. africanum</u> <u>M. microti</u>
Otras especies no cromogénicas <u>M. agri</u> <u>M. chitae</u> <u>M. smegmatis</u>	Complejo <u>M. avium</u> <u>M. avium</u> <u>M. intracellulare</u> <u>M. xenopi</u>
Complejo <u>M. parafortuitum</u> <u>M. parafortuitum</u> <u>M. aurum</u> <u>M. diernhoferi</u> <u>M. vaccae</u>	Complejo <u>M. scrofulaceum</u> <u>M. scrofulaceum</u> <u>M. simiae</u>
Termotolerantes y otras cepas <u>M. flavescens</u> <u>M. phlei</u> <u>M. thermoresistibile</u>	Complejo <u>M. gordonae</u> <u>M. gordonae</u> <u>M. szulgai</u> <u>M. asiaticum</u>
Agentes causales del "Farcy" bovino <u>M. farcinogenes</u> <u>M. senegalense</u>	Complejo <u>M. kansasii</u> <u>M. kansasii</u> <u>M. gastrii</u>
Otras especies escotocromogénicas <u>M. duvalii</u> <u>M. gadium</u> <u>M. gilvum</u> <u>M. komossense</u>	Complejo <u>M. terrae</u> <u>M. terrae</u> <u>M. nonchromogenicum</u> <u>M. triviale</u>
	Otras especies sin requerimientos nutritivos especiales <u>M. marinum</u> <u>M. ulcerans</u> <u>M. malmoense</u>
	Otras especies con requerimientos nutritivos especiales <u>M. paratuberculosis</u> <u>M. haemophilium</u> <u>M. lepraemurium</u> <u>M. leprae</u>

Dentro de los dos grandes grupos de crecimiento lento y rápido, se distinguen a su vez los llamados "complejos de especies" que las agrupa por taxonomía numérica basadas en métodos bioquímicos y comportamiento en cultivo (tabla de complejos). Dentro del complejo *M. tuberculosis* se incluye *M. bovis*, que posee una homología de ADN con *M. tuberculosis* cercana al 100 %. Este hecho, junto con la proximidad antigénica que muestran ambas especies, y las demás del mismo complejo, sugieren que se trata de una sola especie en diferentes fases evolutivas, pero aún no se ha

hecho una propuesta formal para considerarlas subespecies de *M. tuberculosis* (WAYNE y KUBICA, 1986).

Actualmente se reconocen 55 especies dentro del Género *Mycobacterium* (WAYNE y KUBICA, 1986 y HERNANDEZ y DUBON, 1992)

Respecto a la etiología de la tuberculosis en mamíferos, hay que considerar principalmente tres especies implicadas: *M. bovis*, *M. avium* y *M. tuberculosis* (MATHIAS, 1987).

Actualmente existen tres subespecies de *M. avium* en base a su patogenicidad y huésped atacado:

M. avium subesp. avium: productor de tuberculosis en aves

M. avium subesp. paratuberculosis: productor de la paratuberculosis en rumiantes y posiblemente de la enfermedad de Crohn en el hombre.

M. avium subesp. silvaticum: causante de tuberculosis en pájaros y paratuberculosis en mamíferos (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

Otras micobacterias denominadas atípicas han podido ser aisladas de ganglios (paratraqueal y bronquial) de bovinos: *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum* y *M. phlei*, produciendo cuadros asintomáticos, o como saprofitas, por lo que se considera a estos animales como importantes reservorios que los epidemiólogos consideran como muy importantes. El hombre se contamina por vía aerógena, digestiva o cutánea (GARCIA-RODRIGUEZ y cols., 1975). Estudios más recientes realizados por DUFFIELD y cols. (1989), aíslan micobacterias atípicas de ganglios de vacunos tuberculino positivos sin lesiones: *M. flavescens*, *M. terrae complex*, *M. gordonae*, *MAIS complex*. REAL y cols. (1985) aíslan *M. chelonae* de vacuno. *M. kansasii* ha sido descrito recientemente produciendo infección mortal en llama, con lesiones localizadas en ganglios, hígado y pulmón (JOHNSON y cols., 1993).

2.2.- MORFOLOGIA Y TINCION

Las micobacterias son bacilos delgados, de 1,5-4 μm de longitud y 0,3-0,5 μm de grosor, rectos o ligeramente curvados (BARTELS, 1971; GILLESPIE y TIMONEY, 1983; MATHIAS, 1987). Bajo determinadas condiciones se producen filamentos, los cuales

se fragmentan y forman bastoncitos o cocos cuando se alteran. En muestras patológicas suelen estar agrupados y se caracterizan por un gran contenido de sustancias ceras y grasas que impiden o dificultan de manera importante la penetración de los colorantes habituales (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). Sólo después de la actuación de un mordiente durante un tiempo o por calentamiento puede entrar el colorante en el interior de la bacteria, donde queda tan fijado que no se libera ni con ácido ni alcohol (MATHIAS, 1987). Esta ácido-resistencia parece deberse al ácido micólico ($C_{88}H_{176}O_4$) (BARTELS, 1971). La técnica de Ziehl Neelsen con sus numerosas variantes puede considerarse con mucho la más adecuada para demostrar con métodos tintoriales las bacterias tuberculosas. Las tinciones fluorescentes (naranja de acridina), son cada vez más usadas (MATHIAS, 1971). Se emplea también la técnica fluorescente de la rodamina-auramina de TRUANT y cols., (1962). Es difícil teñir estos microorganismos mediante el método de Gram, aunque, a pesar de esto, generalmente se consideran gram positivos (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). Los gránulos de Munch que aparecen en el plasma de los bacilos tuberculosos, gram positivos, de distintos tamaños, son considerados formas especiales de bacilos tuberculosos por su descubridor Munch (MATHIAS, 1987).

Morfológicamente se diferencian porque *M.tuberculosis* normalmente es más largo y delgado que *M.bovis* (MATHIAS, 1987 y GILLESPIE y TIMONEY, 1983), que se presenta como bacilo delgado, en forma de bastoncillo, tanto en tejidos como en cultivos. Muestran pleomorfismo considerable. Algunas veces se tiñe de forma uniforme y otras de forma granular (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). Es de crecimiento rápido (eugenésico) (BARTELS, 1971), mientras que *M.bovis* es de crecimiento lento (disgenésico). *M.avium* presenta un polimorfismo llamativo, hasta el punto que puede presentarse en formas muy cortas, casi cocoides, así como también como bacilos largos (MATHIAS, 1987 ; GILLESPIE y TIMONEY, 1983 y BARTELS, 1971) y es de crecimiento disgenésico (BARTELS, 1971).

2.2.1.- Ultraestructura

Se supone la existencia en el citoplasma hasta de 20 vacuolas

llenas de jugo celular y 1-5 núcleos (BARTELS, 1971).

Pared: Las micobacterias tienen una pared celular bastante gruesa, con un alto contenido de lípidos (60 p.100), en contraste con las paredes celulares de las bacterias gram positivas (menos del 5p.100) y gram negativas (20 p.100). A esta envoltura lipídica probablemente se deben sus características de coloración acidorresistente y su capacidad de no ser destruidas por ácidos o álcalis (GILLESPIE y TIMONEY, 1983 y THOEN y cols. 1988, WOLINKY, 1979), hidrofobicidad en medio líquido, resistencia a los anticuerpos y desecación. También puede ser la causa de su crecimiento relativamente lento, al impedir la asimilación de nutrientes, y de que logren sobrevivir a pesar de las defensas del huésped (GILLESPIE y TIMONEY, 1983).

La pared celular tiene una estructura compleja y está compuesta por cuatro capas (HERNANDEZ y DUBON, 1992):

- 1.- Peptidoglicano con moléculas de N-acetil-glucosamina y ácido N-glicosil murámico.
- 2.- Polímeros de arabinosa y galactosa.
- 3.- Ácidos micólicos.
- 4.- Lípidos superficiales (micósidos, factor cordón y sulfolípidos).

Entre los lípidos superficiales hay que destacar los micósidos, estos son glucolípidos en los que el lípido y carbohidrato están unidos de forma covalente (WOLINSKY, 1979).

Entre los principales lípidos destacan: ácidos grasos de cadena lineal (palmítico y oléico), ácidos grasos de cadena ramificada (ftienoico, micólico y tuberculoesteárico), lípidos neutros (triglicéridos y ceras), fosfolípidos, glicolípidos (factor cordón), y sulfolípidos (HERNANDEZ y DUBON, 1992), ácidos grasos derivados del ftiocerol (dimicosato de ftiocerol, protector de la bacteria (ASSELINEAU y ASSELINEAU, 1984), cera D, micósidos, acilaminoácidos, fosfolípidos y sulfátidos (TAKAYAMA y QURESHI, 1984). Entre los fosfolípidos y sulfátidos, son de destacar el difosfatidil glicerol y fosfatidil inositol-manósido, que impiden la digestión de las micobacterias en los macrófagos (GOODFELLOW y MINNIKIN, 1984). Estos sulfátidos son glucolípidos de la pared celular (THOEN y cols. 1988) que promueven la virulencia del bacilo debido a la inhibición de la formación del fagolisosoma en los macrófagos, consecuentemente la bacteria no está expuesta a los enzimas hidrolíticos de los lisosomas. Estos ácidos grasos incluyen

a los ácidos micólicos entre los que hay que destacar al 6-6'-dimicolato de trehalosa o factor cordón, factor de patogenicidad que se localiza en la capa externa de la pared y que podría intervenir en la absorción de hidratos de carbono del medio (LEDEDER, 1984). El glicolípido que caracteriza la mayoría de los aislamientos de *M. bovis* es el glicolípido fenólico micósido B que ha sido conocido como lípido identificador de *M. bovis*. Cuando el micósido B obtenido de *M. bovis* BCG era examinado el grupo glicosil sustituyente es el 2-O-metil-alfa-ramnopiranososa. *M. bovis* contiene también otros glicolípidos fenólicos, uno de los cuales es una forma deacilada del micósido B (CHATTERJEE y cols., 1989). M. MCNEIL y cols, (1990), demuestran que el micolilarabinogalactano de la pared celular de las micobacterias *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*, responsable de algunos aspectos patogénicos de la enfermedad y de parte de la respuesta humoral, está unido al esqueleto peptidoglicano de la pared celular por un puente actinomiceto específico. Este puente "L-Rhap-(1-3)-D-GlcNAc (1-P)", es un punto a tener en cuenta en la quimioterapia de la infección micobacteriana.

Posee también un esqueleto covalente constituido por el micolato de arabinogalactano ligado a un peptidoglicano (THOEN y cols. 1988) El factor cordón es un complejo lipídico presente en la pared celular de los bacilos tuberculosos virulentos, el cual induce a la sensibilización a la tuberculina, inhibe la quimiotaxis y es leucotóxico.

Membrana celular: con actividad enzimática, actúa como barrera de permeabilidad selectiva (KÖBEL, 1984).

Mesosomas: con papel enzimático, interviniendo también en procesos de división bacteriana (KÖBEL, 1984).

Núcleo: Normalmente de localización central y carente de membrana (KÖBEL, 1984). En el genoma de *M. bovis* y *M. tuberculosis* se ha detectado la secuencia IS1081 que no ha sido encontrada en el ADN de otros actinomicetales (COLLINS y STEPHENS, 1991).

Ribosomas: Sus proteínas estructurales poseen propiedades antigénicas (KÖBEL, 1984).

Inclusiones: de gránulos de polifosfatos y vacuolas lipídicas de función desconocida (KÖBEL, 1984).

Proteínas: Se conocen fundamentalmente aquellas con papel

antigénico y metabólico: Antígenos 5, 6 a y b, tuberculina de Kuwabara, MPB70, proteínas ribosomales, sideróforos como la exoquelina, micobactina (que transporta el hierro al interior de la micobacteria), enzimas: catalasa ureasa, fosfatasa ácida, esterasa, etc (GOODFELLOW y MINNIKIN, 1984).

2.3.- NECESIDADES Y MEDIOS DE CULTIVOS

Todos los bacilos tuberculosos son aerobios, no crecen en condiciones de anaerobiosis (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). Si bien *M.bovis* es microaerófilo y *M.tuberculosis* es altamente aerobio (WAYNE y KUBICA, 1986).

Características de cultivo: Koch fue el primero en cultivar el bacilo tuberculoso en suero coagulado de bovino, por medio de calor (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). El cultivo del bacilo tuberculoso se consigue de forma óptima a temperatura corporal y en medio ácido. El huevo constituye hasta hoy una parte esencial de casi todos los medios sólidos para el cultivo y mantenimiento de bacilos tuberculosos, que a la vez derivan de los medios con huevo introducidos por Dorset en 1902 (MATHIAS, 1987). La incorporación de huevo a los medios de cultivo se debe a la riqueza en lípidos de este y la apetencia que tienen las micobacterias por los mismos (WOLINSKY, 1979). Se han hecho numerosas modificaciones a la fórmula original, y la adición de glicerina a los medios de huevo favorece el crecimiento del tipo humano pero no del bovino. Una de estas modificaciones es el medio de Löwenstein Jensen, que contiene huevo, glicerina y verde malaquita (GILLESPIE y TIMONEY, 1983) recomendado por la *Internacional Union Against Tuberculosis*. Otros medios de cultivo con huevo son : según Gottsäcker, Petragnani, y Hohn, el medio con púrpura de bromocresol de Wagener-Mitscherlich (MATHIAS, 1987). La violeta de genciana y el verde malaquita se agrega a estos medios para impedir el crecimiento de gérmenes contaminantes (ALFRED y KARLSON, 1980). El glicerol se utiliza como única fuente de carbono y sales amónicas como fuente de nitrógeno. Los aminoácidos estimulan el inicio del crecimiento. Dubos introdujo la adición en los medios de cultivo de detergentes no iónicos, tales como el tween, que promueve un crecimiento más disperso de los bacilos (WOLINSKY, 1978). El medio de Stonebrink no contiene glicerina, lo cual no favorece el desarrollo de los bacilos del tipo humano, pero si el de los de tipo bovino, y , por lo tanto suele usarse para el aislamiento

de *M. bovis* (GILLESPIE y TIMONEY, 1983).

Cultivo aerobio estricto. Temperatura óptima: +37°C (mínima +30°C, máxima +41°C, pH 6,3-7,8. Siendo la temperatura óptima de crecimiento para *M. bovis* de +37°C y Ph 5,8-6,9 y para *M. avium subesp. avium* de +38,5°C Ph 6,8-7,3 (BARTELS, 1971). Para *M. tuberculosis* la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C a pH 6,4-7, su crecimiento es favorecido incubando en una atmósfera con 5-10 % de CO₂ (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

En los medios sólidos los bacilos tuberculosos se multiplican con lentitud. El tipo aviar se multiplica más rápidamente que los otros dos, y el humano crece con más facilidad y rapidez en comparación con el bovino. Para referirse a la facilidad de desarrollo de los bacilos en medios de cultivo los investigadores ingleses han utilizado los términos de eugónico para el tipo humano y disgónico para el bovino (GILLESPIE y TIMONEY, 1983).

En los medios sólidos, las colonias jóvenes son pequeñas, aparecen como diminutos copos opacos que de manera gradual crecen hasta formar masas irregulares, secas, que sobresalen de la superficie del medio. Cuando los cultivos se han acostumbrado al medio se observa un desarrollo confluyente que cubre toda la superficie, su aspecto es céreo y lustroso, pero después de varias semanas de incubación se observa grueso y rugoso. En medios líquidos, el crecimiento está restringido a la superficie. Los tipos bovino y humano presentan una superficie muy seca y rugosa mientras el aviar es más blando, más húmedo y menos rugoso. Debajo de la película de los cultivos del tipo bovino y humano muestran un medio perfectamente claro, con poco o nada de sedimento. Los tipos aviares muestran a menudo abundante sedimento mucoide y formación de estalactitas viscosas que se extienden hacia abajo de la película cuando los cultivos envejecen (GILLESPIE y TIMONEY, 1983)

Distintos autores recomiendan la descontaminación de las muestras antes de su primoaislamiento. Así tenemos el método de Petroff que utiliza sosa 1N y una solución neutralizante de ácido sulfúrico al 4 % (RODRIGUEZ y cols., 1983). J. RODRIGUEZ y cols., 1983 y M. CASAL, 1990 trabajan con una modificación del mismo utilizando la sosa al 1 %. Método de A. TAQUET y TISON (1961) que es el método del Lauril-Sulfato de Sosa. L.A. CORNER y TRAJSTMAN (1988) recomiendan utilizar clorito 1-hexadecylpyridimun al 0,75 % en lugar de la sosa al 2 % ya que se muestra igual

de efectivo presentando la ventaja de que no requiere la neutralización con ácidos, siendo menos tóxico para *M. bovis* aumentando el rango de crecimiento y apareciendo colonias más tempranamente.

Existen otros métodos de descontaminación : método de N-acetil cisteína (que utiliza NaOH 4 %) y el de Karlson (que utiliza NaOH 2 %), ambos descritos por A. ORTEGA y MARCH (1979). Estos mismos autores recomiendan la no utilización de la sosa al 4 % ya que a esta concentración es altamente lesiva para los bacilos tuberculosos y mucho más para las micobacterias atípicas. Otros métodos son el de Teepol, Löwenstein (CASAL, 1990).

2.3.1.- Medios de cultivos recomendados para el aislamiento de *M. tuberculosis*

En los años 50 los mejores resultados para el crecimiento de micobacterias se obtenían en medios con base de huevo (CALMELS y BIVERT, 1952). Otros medios como: agar sangre, agar carbón y otros similares, no consiguieron ninguna mejora considerable frente al clásico Löwenstein (GUTIERREZ y BOJALIL, 1953; GUTIERREZ, 1958). Los cultivos líquidos, tan utilizados para el estudio y mantenimiento de cepas así como para enriquecimiento de muestras no aportan mucho para el aislamiento primario teniendo, por el contrario, grandes inconvenientes, siendo el más grande la elevada tasa de contaminación que proporcionan. Esto hace que no se haya podido sustituir el clásico medio con base de huevo en el primocultivo (ORTEGA y MARCH, 1982). A. ORTEGA y MARCH (1989), comparan tres medios de cultivo para el primo aislamiento de *M. tuberculosis*. Los medios utilizados son: Löwenstein, Löwenstein con piruvato y Coletsos, obteniendo un mayor número de aislamientos con el Coletsos. También investigan las siguientes combinaciones: Löwenstein y Löwenstein-piruvato, Löwenstein y Coletsos, Löwenstein con piruvato y Coletsos; resultando esta última la mejor asociación. Recomiendan al menos la utilización de dos medios de cultivo, para incrementar las posibilidades de éxito. Otros medios utilizados son: Löwenstein Jensen, Petragnani, Middlebrook 7H10 y Middlebrook 7H11 (medio de Mitchison) (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

Medio MB-CHECK^R (CASAL y CLEMENTE, 1989), cultivo bifásico para el aislamiento de micobacterias, hay un 6 % más de crecimiento que con el clásico de Löwenstein-Jensen. No sólo se

obtiene un mayor número de cultivos positivos, sino que se consiguen en menor tiempo, y en algunos casos facilita la identificación. Sería pues un sistema parecido al BACTER* 460 TB^R, más lento que este, pero sin los problemas de radioactividad. El BACTER 460 TB^R es un sistema radiométrico que utiliza Middlebrook 7H12 (CONVILLE y WITEBSKY, 1989). Este sistema está basado en la cuantificación de ¹⁴CO₂ producido por el metabolismo bacteriano al metaboliza ¹⁴C del sustrato, lo cual le ha dado mayor rapidez en el primo-aislamiento de micobacterias, detectando un 96 % respecto a cultivos convencionales que detectan un 46 % (HOFFNER y cols., 1989). Recientemente algunas mejoras han sido añadidas a este sistema Bactec, el Bactec PANTA solución es recomendado para reducir la contaminación pues lleva añadido antibióticos (LIBONATI y cols., 1986; SIDDIQI y HWANGBO, 1986). La fiabilidad es similar a la de los cultivos convencionales pero presenta el inconveniente del elevado coste y la necesidad de unas instalaciones adecuadas para el uso de isótopos radioactivos, por lo que el número de muestras ha de ser grande para que resulte rentable (CAMINERO, 1992).

2.3.2.- Medios recomendados para el aislamiento de *M. bovis*

El medio B83 agar, es una modificación del medio de M.S. TARSHIS (1953), realizado por el Dr. Kovacs. Este medio utiliza sangre bovina, piruvato sódico y L-asparagina. D.V. COUSINS y cols. (1989), lo compara con Middlebrook 7H-11, Stonebrink y Stonebrink con cristal violeta para obtener primoaislamiento de *M. bovis*. El mayor número de aislamientos se obtuvo por igual con B83 como con Stonebrink, pero B83 resultó más rápido y es un medio simple y económico de preparar.

Otros medios utilizados: Löwenstein-Jensen con piruvato pero sin glicerol, medio modificado de Middlebrook 7H11 con ácido oleico y albúmina, agar sangre bovina para tuberculosis y agar yema de huevo (HERMOSO y CARDENAL, 1992). Se recomienda que los medios para aislamiento de *M. bovis* sean sin glicerol y mejor si llevan un 0,4 % de piruvato sódico (HERNÁNDEZ y DUBÓN, 1992). La mayoría de las cepas de *M. bovis* tienen preferencia en su crecimiento por medios que contengan piruvato, aunque las hay con una preferencia mínima e incluso sin preferencia (GRANGE y cols. 1990).

El medio de Middlebrook aventaja al Löwenstein por su precocidad en cuanto a los crecimientos. El medio de Dubos , es un medio líquido bastante precoz en el que se aprecia crecimiento alrededor de los 7 días. Este se puede enriquecer con ácido oleico y albúmina dando buenos resultados en muestras con pocos bacilos. Medio de Proskauer-Beck, modificado por Youmans y Karlson, este es un medio económico y fácil de realizar, permite realizar la técnica de la niacina (ORTEGA y MARCH, 1979). Otros medios empleados son: Middlebrook 7H-9, Middlebrook 7H-10, Middlebrook 7H-11, Middlebrook 7H-12, Löwenstein-Jensen, Löwenstein con piruvato, Löwenstein CFA, Löwenstein, Coletsos, Stonebrink, Müller Hinton (CASAL y CLEMENTE, 1990).

2.3.3.- Otros medios de cultivo

Medios para el aislamiento de *M. avium*:

Se utilizan medios enriquecidos con micobactina (WAYNE y KUBICA, 1986). Así THOEN y cols. (1975) utilizan con buenos resultados el agar yema de huevo Herrold, al que le añade verde malaquita y micobactina.

Medios diferenciales:

Los más conocidos son: el medio sintético para observar la fermentación de azúcar, MacConkey modificado, medio con TCH (hidracida del ácido 2-tiofenocarboxílico), PNB (ácido paranitrobenzoico), con rifampicina, medio agar de Sauton (CASAL, 1990).

2.4.- RESISTENCIA A AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

A parte de esta alcohol ácido resistencia de su coloración, las micobacterias son resistentes a un gran número de sustancias químicamente agresivas , a disolventes y también a medios de oxidación-reducción.

Los bacilos tuberculosos no forman esporas y poseen

resistencia moderada al calor. Son destruidos por la pasteurización (GILLESPIE y TIMONEY, 1983), Si bien, G. ROSENBERG (1983), dice que la pasteurización, ya sea corta o larga, tampoco garantiza la eliminación de los agentes de la tuberculosis contenidos en la leche. *M. bovis* es una de las micobacterias menos termorresistentes, muere al ser expuesta a 60°C durante 16 minutos y muere a 70-75°C durante 10 segundos (PAVLAS M., 1990). Son sensibles a la acción de los rayos solares, pero son relativamente resistentes a la desecación. La propiedad de resistencia a los ácido y álcalis es aprovechada a menudo para aislar bacilos tuberculosos de esputos o exudados contaminados por otros microorganismos. En los suelos húmedos, en los montones de estiércol y en las gavillas de paja viejas el bacilo tuberculoso se conserva vivo durante mucho tiempo (GILLESPIE y TIMONEY, 1983). En los desagües pueden mantenerse vivos hasta 15 meses (ROSENBERG, 1983). En leche acidificada no mueren en 15 días, tampoco los daña el cuajo y acidificado del queso blando. En la manteca dulce y cremosa se mantiene 4 semanas. En cambio en la manteca ácida y salada (4-6 % de ClNa) mueren en 10, a veces 5 días. Excepcionalmente se mantienen 45 días. Se encuentran bacterias de tuberculosis en quesos duros de 4-5 meses de maduración (ROSENBERG, 1983). Inclusive en preparaciones teñidas por el método de Ziehl Neelsen y con naranja acridina y que fueron fijadas a la llama o en esterilizador de aire caliente (5 minutos a +105°C) se pudieron aislar bacterias tuberculosas virulentas. La muerte se logra en 4 h con fenol al 2 %, cresol al 1 % y formalina al 3 %, en 10 minutos con etanol al 80 % (BARTELS, 1971) Son sensibles al ácido fénico y el cresol al 5 % (ROSENBERG, 1983), también se muestran sensibles a los halógenos (hipoclorito sódico y povidona yodada), carbanilidas y clorhexidina (CASAL, 1990). Entre los desinfectantes más eficaces se encuentra el sublimado corrosivo y una serie de compuestos orgánicos como fenol, cresoles y creosota (BIBERSTEIN, 1990).

Las micobacterias tuberculosas son resistentes a la penicilina, pero lábiles a la estreptomycin (ROSENBERG, 1983 y HERNANDEZ y DUBON, 1992) y rifampicina (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

2.5.- ESTRUCTURA ANTIGENICA

En las micobacterias se han detectado unos 30 antígenos

diferentes. Algunos de estos antígenos son específicos de especie, otros son comunes a diversas micobacterias, nocardias y corinebacterias (WOLINSKY, 1978).

Polisacáridos con capacidad antigénica: D-arabino-D-galactano y el D-arabino D-manano (HERMOSO y CARDENAL, 1992), fosfatidil inositol dimanosido y el fosfatidil inositol pentamanosido de *M. bovis* (TEPLIZKI y cols. (1987) .

Proteínas antigénicas: antígeno 5, antígeno 6 a y b , la proteína tuberculínica de Kuwabara, proteína MPB 70 (destaca en *M. bovis*), proteínas ribosomales y proteínas enzimáticas. De todas el **antígeno 5** tiene una potencia de reacción similar a la de la tuberculina PPD humana. Entre 14 especies investigadas este antígeno se ha hallado sólo en *M. tuberculosis* y *M. bovis*. De ahí su potencial utilidad como antígeno específico en técnicas diagnósticas cutáneas cuando hay reactividad cruzada por micobacterias inespecíficas. También es importante la proteína activa tuberculínica de Kuwabara, que es capaz de inducir a una potente acción tuberculínica en seres humanos infectados (WOODFELLOW y MININKIN, 1984).

Entre los antígenos más conocidos tenemos al **antígeno 60** de *M. bovis* (BCG) (FADDA y cols., 1992), y *M. tuberculosis* (HUBBARD, 1992). El A60, es un antígeno macromolecular, termoestable, que se encuentra en la tuberculina vieja y PPD y ha sido purificado del citoplasma de *M. bovis* BCG (COCITO y VALINDEN, 1986). A60 es un inmunógeno poderoso desarrollando reacción de hipersensibilidad (COCITO y cols., 1987). Este antígeno puede ser fraccionado en 15 bandas proteicas cuando es analizado por Western blotting (HUBBARD, 1992). R.D. HUBBARD (1992) ensaya la inmunización de ratones con este antígeno, detectando una reducción significativa del número de micobacterias viables pero menor que la observada tras la aplicación de BCG. El antígeno A60 de *M. bovis* (BCG) (FADDA y cols., 1992), y *M. tuberculosis* (HUBBARD , 1992) es un antígeno macromolecular, termoestable. Es un antígeno utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis humana (CHARPIN y cols., 1990), siendo efectivo también en la detección de anticuerpos en pacientes bajo tratamiento cuyo cultivo es negativo, detectando niveles de anticuerpos solamente en un 45 p.100 de estos individuos (FADDA y cols., 1992).

Otros antígenos proteicos obtenidos de *M. bovis* y *M. tuberculosis* son: alfa antígeno, MPB64, MPB59, MPB80, MPB70. El **alfa**

antígeno ha podido ser también aislado de *M.kansasii* (MATSUO, 1991). El antígeno MPB70 fue por primera vez descrito por NAGAI y cols. (1981). Es una proteína purificada obtenida mediante filtración de un cultivo de tres a cuatro semanas de *M.bovis BCG (cepa Tokio 172)*, en su composición de aminoácidos no se encuentra la cisteína ni el triptófano y se describe como estrictamente específica de *M.bovis*. Es una proteína estable, pero cuando es mantenida a 95°C durante 30 minutos a pH 5-7,5 u 8,7 algunos de sus productos se degradan. Su peso molecular obtenido por sedimentación es de 15000, por electroforesis (SDS-PAGE) es de 18000 kDa, su coeficiente de sedimentación es de 1.9 S. Esta proteína se encuentra en alta concentración en algunas cepas de *M.bovis BCG: Tokyo, Moreau, Russian, Sweden, Glaxo, Copenhagen, Tice y Pasteur*, también existe en *M.bovis Ravenel* y en *M.tuberculosis H37Rv*. La mayor concentración es obtenida en *M.bovis Ravenel*, seguida por la cepa *Tokyo* (HARBOE y cols., 1984). S. NAGAI y cols. (comunicación personal cit. ABOUD-ZEID y cols., 1987) obtienen un peso molecular para esta proteína de 22 kDa mediante electroforesis. C. ABOU-ZEID y cols. (1987) describen una proteína dimérica de 46 kDa formada por dos subunidades de 23 kDa detectada en filtrados realizados a distintas cepas de *M.bovis BCG: Brazilian, Japanese y Russian* también presente en otras cepas pero en menor cantidad (*British y Merieux*) y no detectada en las cepas *Czechoslovakia, Dakar, Danish, Dutch, French, Indonesian y Tice*. Esta proteína dimérica es más abundante en el sobrenadante de cultivos de cinco días que en el de cultivos viejos. Ya S. NAGAI y cols. en 1981 observaron una proteína distinta a MPB70 que denominaron MPB70a, esta se diferenciaba de la anterior en que era ligeramente más ácida no observándose otra diferencia entre ellas, existiendo la posibilidad de que alguna sustancia ácida de ajo Pm abandone a MPB70. C. ABOU-ZEID y cols. (1987) al realizar filtrados de la cepa *japanese* observan otra proteína de 23 kDa distinta a MPB70 y que ha sido observada también en otras cepas como: *M. tuberculosis H37RV y Aoyama B*, dicha proteína se denomina MPB64 y mediante la técnica *Western-blotting* usando anticuerpos monoclonales se muestra inmunológicamente distinta a MPB70, siendo también distinto en su grupo N-terminal. Al analizar a la proteína MPB70 por el método ELISA se detectan tres lugares específicos en *M.bovis* para este antígeno (MIURA y cols, 1983; WOOD y cols., (1989). Este antígeno es uno de los componentes más inmunorreactivos de *M.bovis* (FIFIS y cols, 1989). R.G. HEWINSON y RUSSELL (1993) mediante la expresión y la secreción por *Escherichia coli* observan formas recombinantes de la proteína MPB70 con distintas masas moleculares, así describen

una de 26 kDa y otra de 22 kDa, la unidad de 22 kDa de esta proteína era predominante. Un filtrado de un cultivo viejo contenía solamente la unidad proteica de 22 kDa, la cual era soluble. T. FIFIS y cols. (1991) observan que la proteína MPB70 puede mostrar otros pesos moleculares dependiendo del carohidrato asociado a MPB70, poniendo en evidencia la existencia de formas glucosadas de esta proteína. La forma más frecuente encontrada en los cultivos viejos es la de 22 kDa que representa la forma puramente proteica de MPB70. Más recientemente A. GOODGER y cols. (1994) trabajan con una proteína de 25 kDa la cual es identificada como inmunodominante en tejones infectados, esta proteína la purificaron de *M.bovis* y la describen similar a la forma glucosada de MPB70 de 25 kDa descrita previamente por T. FIFIS y cols. (1991).

El antígeno MPB70 es uno de los componentes más inmunoreactivos de *M.bovis*, reconociendo la mayoría de los animales infectados por *M.bovis*. Su especificidad por la técnica ELISA es superior a la detectada utilizando como antígeno un filtrado crudo de *M.bovis*, observándose un menor porcentaje de falsos positivos. Este antígeno induce una fuerte respuesta celular, tanto *in vivo* como *in vitro* (FIFIS y cols., 1989). Ha sido ensayado mediante ELISA, Dot blot, Western-blotting, observándose solamente reacciones cruzadas con *M.tuberculosis* (WOOD y cols., 1988 y 1989). También se han obtenido reacciones cruzadas con *Nocardia asteroides* (HARBOE y NAGAI, 1984). Es el principal antígeno de las cepas vacunales de BCG, así como de las cepas de *M.bovis* virulentas. Por lo cual, al ser utilizado como antígeno de diagnóstico no diferencia entre cepas vacunales y cepas virulentas (RADFORD y cols., 1988). Este antígeno utilizado en la técnica ELISA no muestra reacciones cruzadas con *M.avium*, *M.paratuberculosis* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* observándose que la formación de anticuerpos a MPB70 es altamente específica de la infección por *M.bovis*, lo que puede significar un aumento de la sensibilidad de los procedimientos de diagnóstico en la infección natural por *M.bovis* (HARBOE y cols., 1990).

MPB64 es una proteína inmunógena obtenida mediante cultivo y filtración de una cepa japonesa de *M.bovis* BCG. Su peso molecular es de 23 kDa-27 kDa (HARBOE y cols, 1986). MPB64 y MPB70 son proteínas inmunológicamente distintas y estructuralmente se diferencian en la secuencia de los aminoácidos del grupo N-terminal (MIURA y cols., 1983).

MPB80 es otro antígeno proteico obtenido mediante técnicas

de filtración de un cultivo de *M. bovis* BCG cepa *Tokio*, con un peso molecular de 18 kDa obtenido mediante electroforesis, tiene el mismo grupo amino-N-terminal que la proteína MPB70, no puede diferenciarse de este mediante el uso de técnicas inmunológicas pero el punto isoeléctrico de ambas es distinto (HARBOE y cols., 1986). Asimismo, MPB70 y MPB80 no son antígenos estrictamente específicos de *M. bovis*, aunque son producidos en mayor abundancia por *M. bovis* que por *M. tuberculosis*. De esta diferencia cuantitativa, MPB70 puede ser considerado específico de *M. bovis* (HARBOE y NAGAI, 1984). Otro antígeno de *M. bovis* BCG subcepa *Tokio* es el MPB59, distinto a MPB64, MPB70 y a MPB80. Es una proteína que da reacciones cruzadas con otras micobacterias y capaz de inducir respuesta humoral en armadillos y monos con infección micobacteriana sistémica por *M. leprae*. Por electroforesis da una sola banda de 28 kDa. Este antígeno pertenece al complejo antigénico de BCG 85B (WIKER y cols., 1986).

T. FIFIS y cols. (1991) estudian 10 antígenos de un cultivo filtrado de *M. bovis*. Estos son: 39, 32, 30, 25, 24, 22 (a - b), 19, 15 y 12 kDa. Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y/o secuencia N-amino terminal, se encontró que las fracciones de: 32, 30, 24, 22a, 19 y 12 kDa, se correspondían con los antígenos: P32, MPB59, MPB64, MPB70, 19 kDa y 12 kDa, respectivamente, que eran antígenos descritos de *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Los antígenos de 39, 25, 22b y 19 kDa, mostraron la propiedad de unirse a la concavalina A y eran positivos a la técnica de detección de glicanos, sugiriendo que estos antígenos eran de naturaleza glicoproteica. Las proteínas de 25 y 22b kDa resultaron ser formas glicosadas del antígeno proteico MPB70. La diferencia entre ellos es debida al carbohidrato asociado. Los carbohidratos asociados a estas glicoproteínas son: arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y N-acetil glucosamina en distintas proporciones. También estas proteínas tienen un grupo N-terminal distinto entre ellas. MPB70 es la proteína más abundante en cultivos viejos. El antígeno MPB59 fue anteriormente descrito por H. WIKER y cols. (1986) obtenido de un cultivo de BCG subcepa *Tokyo* y su peso molecular quedó establecido en 28 kDa mediante electroforesis. Es una proteína que da reacciones cruzadas con otras micobacterias, induce a una elevada respuesta humoral en armadillos y monos durante el desarrollo de la infección sistémica micobacteriana después de que estos hayan sido inoculados con *M. leprae*.

A. CHANDRAMUKI y cols. (1989), utilizan los antígenos 14,

19, 38 y 65 kDa y lipoarabinomanano para el diagnóstico de la meningitis tuberculosas humana por *M.tuberculosis*, observando que dan buenos títulos el lipoarabinomanano y el antígeno de 14 kDa detectando IgG.

Los antígenos glucolípidos (PPTR, PGL-TB1, SL-I, SL-IV) de *M.tuberculosis*, no reaccionan con sueros de individuos infectados por *M.bovis*. Sueros de conejos inmunizados con cada antígeno reaccionan exclusivamente con el correspondiente antígeno, lo que significa que estos antígenos son marcadamente específicos. Todos estos antígenos inducen a la formación de IgG en conejos excepto PPTR. Antisueros de *M.leprae* reaccionan con antígeno purificado SL-IV, y el resto tan solo con *M.tuberculosis* y *M.africanum* (PAPA y cols., 1989).

2.6.- COMUNIDAD ANTIGENICA

Según C.S. CUMMINS (1962) existe un antígeno común en todas las cepas de *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia*.

También están los que afirman la existencia no de un antígeno común sino de una amplia gama de componentes antigénicos entre *Mycobacterium* y otros microorganismos estrechamente relacionados tales como *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (PIER y cols, 1986; GILMOUR y col., 1972; RIDELL 1977; GUNNARSON y FODSTAD, 1979; JORGENSEN 1981, MCKENZIE y col., 1981; WILKS y cols, 1981; MARTIN, 1983; LEON, 1985; YOKOMIZO y cols., 1985).

E. GUNNARSON y FODSTAD (1979) llegaron a considerar hasta 44 antígenos en *M.paratuberculosis*, algunos de los cuales son comunes a *M.avium* y *M.bovis*. Dato importante a la hora de practicar la intradermorreacción para el diagnóstico de la tuberculosis.

Asimismo, podrían producirse reacciones cruzadas entre *Hipoderma bovis* y las micobacterias productoras de tuberculosis. Esta cuestión fue planteada por M.D. RODRIGUEZ y cols. (1983) que encuentran el desconcertante hecho observado repetidamente de que los animales (vacunos), diagnosticados como positivos mediante la intradermorreacción no presentaban lesiones en matadero. Ellos estudiaron la relación entre tuberculino positividad

de una res no tuberculosa y la existencia en la misma de una infestación por *Hipoderma spp.* no pudiendo constatar la existencia de una reacción cruzada entre la tuberculina y la infestación por *Hipoderma spp.*, aunque dejan abierta la posibilidad.

C.J. THORNS y MORRIS (1986) usando anticuerpos monoclonales describe lugares antigénicos comunes entre *M. bovis* y otras bacterias e incluso parásitos, produciendo reacciones cruzadas en el desarrollo diagnóstico de las técnicas serológicas cuando investigamos infecciones por micobacterias.

Incluso el antígeno MPB70 de *M. bovis* y *M. tuberculosis* presenta reacciones cruzadas con sueros anti-*Nocardia asteroides* (HARBOE y NAGAI, 1984; KUCHINKA y cols., 1999) y con anti-*Rhodococcus equi* (KUCHINKA y cols., 1990).

3.- EPIDEMIOLOGIA

3.1.- EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA

3.1.1.- Factores Dependientes del Hospedador

S.A. GRIFFITH (1928, cit. LUKE, 1958), M.F. THOREL (1984), K.V. JUBB y cols. (1985) citan a la cabra como una especie resistente a la tuberculosis. Esta relativa inmunidad a la infección natural es atribuida a las condiciones de manejo. El que la tuberculosis caprina no se diagnostique puede ser debido a la existencia de paratuberculosis, fuertes parasitaciones o a la presencia de linfadenitis caseosa pulmonar, cuyas lesiones macroscópicas pueden enmascarar el diagnóstico de campo de esta enfermedad (FUENTES, 1987).

J. EDINGTON (1989), se plantea dos cuestiones:

- Hay controversia en cuanto a la resistencia natural de la cabra a la infección tuberculosa.
- Las cabras son más susceptibles a la tuberculosis por las especies bovina o aviar.

No obstante son numerosos los casos de tuberculosis

caprinas descritos a partir del año 1928 (GRIFFITH cit. LUKE, 1958).

Es por estos hallazgos por lo que muchos autores opinan que la cabra no posee una especial resistencia al padecimiento de la tuberculosis. La susceptibilidad de las cabras a la infección experimental ha sido señalada por S.A. GRIFFITH (1907 cit. LUKE, 1958), que comparó la infección subcutánea dando las mismas dosis de bacilos tuberculosos a cabras y ganado vacuno, observando que en todos los casos las lesiones que presentaron las cabras eran más extensas que las del vacuno. Sí que parecen tener una mayor resistencia a la infección por *M. tuberculosis* el cual solamente produce en caprino al igual que en vacuno una pequeña lesión regresiva (GRIFFITH, 1911, COBBETT, 1917, CARMICHAEL, 1938, todos cit. LUKE, 1958).

Son especialmente sensibles animales adultos entre 6-10 años, observándose un mayor porcentaje en animales gestantes y en lactación (DAVENAS y DABRIGEON, 1955),

K.N. SOLIMAN y cols. (1953) están de acuerdo con la afirmación anterior, si bien observan la afección entérica de chivos por *M. tuberculosis*. Según BILLON (1944) la influencia de la edad de los animales es manifiesta. La mayor parte de los casos provienen de animales que han sufrido un desgaste por gestaciones y lactaciones sucesivas. Todo esto explicaría el hecho de que esta enfermedad sea más frecuente en la cabra que en el macho cabrío (THOREL, 1984).

Reservorios

En primer lugar hay que citar las vacas tuberculosas infectadas por *M. bovis* que viven próximas a las explotaciones de ganado caprino (MILNE, 1955; DAVENAS y DABRIGEON, 1955; MEISSNER, 1973; FILLET, 1989). Las aves silvestres (LESSLIE y cols., 1960) y los patos infectados por *M. avium* pueden contagiar a cabras vía oral (EDINGTON, 1989), o mamíferos salvajes infectados por *M. avium complex* (ANDERSEN y KING, 1993).

Aparte de la cabra cada vez son más los aislamientos de *M. bovis* en animales de vida salvaje tal como el tejón (*Meles meles*) que pueden actuar de reservorios de *M. bovis* para el ganado vacuno (CHEESEMAN y cols., 1989; BENHAM y BROOM, 1989; WILESMITH, 1991), Los tejones infectados con bacilos tuberculosos

pasan a través de un espectro de situaciones inmunológicas durante la mayor parte de las cuales es poco probable que constituyan importantes fuentes de infección. En los primeros estadios los bacilos tuberculosos son excretados a partir de las lesiones infectadas, mientras que en los estadios ulteriores el fracaso de la inmunidad mediada por células da como resultado excreción de bacilos tuberculosos de otras regiones orgánicas, y el animal se transforma en una fuente potencial de infección (MAHMOOD y cols., 1987-a). Otro animal salvaje que actúa como reservorio en algunos sitios del mundo es el oposum australiano (*Trichosurus vulpecula*) (ECKDAHL y cols., 1970). Los ciervos pueden actuar como reservorios de *M.bovis* y *M.avium* (STUART, 1988; ROBINSON y cols., 1989; FRANK y cols., 1989).

En condiciones naturales *M.bovis* causa enfermedad principalmente en el ganado vacuno (reservorio por excelencia del bacilo y especie más susceptible a la enfermedad), hombre, cerdo, y ocasionalmente caballos, perros, gatos y pequeños rumiantes (JUBB y cols., 1985).

Especies sensibles a *M.bovis*:

En otras especies animales *M.bovis* tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores de todos los patógenos conocidos. Tiene como "hospedador primario" a la vaca (el más susceptible), el cerdo y el hombre (FRANCIS, 1958; MEISSNER, 1973; LEPPER y CORNER, 1983). Así, es reconocido por varios autores (THOEN y cols., 1979; RODRIGUEZ y cols., 1983; WEBER y cols., 1989; GRANGE y cols., 1990). E.A. ASTASHOVA y KADOCHKIN (1989) que han observado que las formas L de *Mycobacterium bovis* no desarrollan en ganado bovino lesiones tuberculosas. También se cita al hombre (CORRÊA y CORRÊA, 1974; KUBIN y cols., 1984; THOEN y cols., 1984; BENET, 1990; y FANNING y EDWARDS 1991) y ganado porcino (ROYAL COMISIÓN ON TUBERCULOSIS, 1911 cit. LUKE, 1958; CORNER y cols., 1981; THOEN y cols., 1984; ; 12TH CONFERENCE, 1987; TAPPARELLI y MARZADORI, 1990).

Como "hospedadores secundarios o esporádicos" tenemos al caballo, perro, gato y pequeños rumiantes (FRANCIS, 1958; LEPPER y CORNER, 1983). Así son muchos los autores que citan la tuberculosis en estas especies :caballos (M'FADDYAN, 1924, STABLEFORTH, 1929, GLOVER, 1949; todos cit. LUKE, 1958), ovejas (M'FADDYAN, 1900; CARMICHAEL, 1937; CREECH, 1940 todos cit. LUKE, 1958; THOEN y cols., 1984); perros, gatos

(THOEN y cols., 1984, GUNN y JENSKINS, 1994).

En los animales salvajes la infección por *M.bovis* se ha descrito en el visón (ROYAL COMISIÓN ON TUBERCULOSIS, 1911 cit. LUKE, 1958; FRANCIS, 1958; LEPPER y CORNER, 1983; HEJLICEK y cols., 1973; THOEN y cols., 1984), el ciervo (ROYAL COMISIÓN ON TUBERCULOSIS, 1911 cit. LUKE, 1958; FRANCIS, 1958; LEPPER y CORNER, 1983; THOEN y cols., 1984; FLEETWOOD y cols., 1988; STUART, 1988; FRANK y cols., 1989; ROBINSON y cols., 1989; GRANGE y cols., 1990; FANNING y EDWARDS, 1991), tejón, (FRANCIS, 1958; LEPPER y CORNER, 1983; THOEN y cols., 1984; BEHAM y BROOM 1989; GRANGE y cols., 1990), el oposun australiano (FRANCIS, 1958; LEPPER; ECKDAHL y cols., 1970; LEPPER y CORNER, 1983), camello, mono (THOEN y cols., 1984) y otros como el búfalo, marsupiales, liebre, conejo, antílope, elefante, visón, topo, hurón y rata (FRANCIS, 1958; LEPPER y CORNER, 1983).

Entre las especies que se citan como sensibles a *M.tuberculosis* se encuentra el caballo (GRIFFITH, 1987, cit. LUKE, 1958), cerdo (ROYAL COMISSION ON TUBERCULOSIS, 1911 y COBBETT, 1922, ambos cit. LUKE, 1958) y oveja (VAN ES, 1925 cit. LUKE, 1958) y entre las especies sensibles a *M.avium* el caballo (M'FADYEAN, 1918 y WERDELIN, 1925; ambos cit. LUKE, 1958); cerdo (VAN ES, 1925 y ROYAL COMISSION, 1911, BANG, 1913, KLIMMER, 1930, PALLASKE, 1931 todos cit. LUKE, 1958), oveja (GRIFFITH, 1925; CREECH, 1940; HARSHFIELD y RODERICK, 1934, todos cit. LUKE, 1958); vacuno (THOEN y cols., 1979; THOEN y cols., 1981; WEBER y cols., 1988; ALFREDSEN y cols., 1990); ciervos (STUART, 1988; FRANK y cols., 1989; ROBINSON y cols., 1989).

J. CARMICHAEL (1941), opina que la influencia de "la raza" en el ganado vacuno no puede juzgarse con certeza. El que la enfermedad se presente con mayor frecuencia en ciertas razas está más relacionado con la forma de vivir de estas y con el tipo de explotación. Así la enfermedad es más rara en animales en zonas libres que en los que viven estabulados. Son más sensibles animales viejos, vacas de producción lechera debido a que su período productivo es mayor que las destinadas a la producción cárnica, como animales expuestos a causas externas que disminuyan sus defensas (establos mal ventilados, húmedos y sucios, alimentación inadecuada e insuficiente, excesiva explotación del rendimiento lácteo, etc). Existe un gen autosómico dominante que controla la

susceptibilidad a la tuberculosis. La expresión de este gen ha sido definida como la no activación específica de macrófagos en la función bactericida, estudios que se han realizado en ratón (SKAMENE, 1991).

3.1.2.- Factores Dependientes del Agente

El principal agente etiológico responsable de la tuberculosis caprina es *M.bovis* (LITTLE, 1924, IYER, 1932, CARMICHAEL , 1937, MOHAN 1950 , todos cit. LUKE, 1958; MILNE, 1955; DAVENAS y DABRIGEON, 1955; SCHLIESSER, 1973; BEER, 1987 ; PERRIN, 1984) GILESPIE y TIMONEY, 1983; DE LA HAYE, 1987; FUENTES, 1987; BERNABE y cols., 1990-91 (A-B); BERNABE y cols., 1991; GOMEZ y cols., 1992; ACOSTA y cols., 1993) , aunque también se describen casos producidos por *M.avium* (PLUM, 1935 cit. LUKE, 1958, SOLIMAN y cols., 1953; LESSLIE y cols., 1960; SCHLIESSER, 1973; GILESPIE y TIMONEY, 1983; VIALLIER y cols., 1983; SHARMAN y cols., 1985; BEER, 1987 ; FUENTES, 1987; EDINGTON, 1989 y ANDERSEN y KING, 1993), y tan solo algún caso aislado por *M.tuberculosis* (SOLIMAN y cols., 1953; SHARMAN y cols. 1985; VERA y cols., 1989) y *M.kansasii*(ACOSTA y cols., 1993).

3.1.2.- Factores Dependientes del Medio Ambiente

M.bovis es una bacteria moderadamente resistente al calor, desecación y muchos desinfectantes (las características hidrófobas de su superficie impiden la fijación y penetración del producto desinfectante en la célula bacteriana). En suelos ácidos parece que aumenta la resistencia del bacilo, por lo que podría ser beneficioso la adición a estos suelos de cal para incrementar su alcalinidad. Es fácilmente destruido por la luz solar directa, a menos que esté en un ambiente húmedo. En ambientes templados, húmedos y protegidos, puede permanecer viable durante algunas semanas e incluso meses (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1983).

3.1.3.- Fuentes de contagio y vías de contagio

La frecuencia de la tuberculosis caprina es pequeña, aunque puede constituir una fuente de infección importante para los bóvidos con peligro también para la salud pública. Las principales fuentes de contagio vienen representadas por: el esputo pulmonar, las heces, la leche, la orina, flujo vaginal y semen (FUENTES, 1987).

La tuberculosis caprina por *M.bovis* es una enfermedad bacteriana con tropismo respiratorio, de importancia epidemiológica, que puede actuar como fuente de contagio para el hombre y otros animales, especialmente para el ganado bovino (PERREAU P. y SAVEY M., 1982).

Las cabras se infectan preferentemente vía aerógena (por inhalación) cuando la infección es debida a *M.bovis* (MILNE, 1955; SCHLIESSER, 1973 y BEER, 1987), principalmente por cohabitación con bovinos enfermos (DAVENAS y DABRIGEON, 1955; THOREL, 1984). La eliminación del agente causal se verifica en esta especie de forma semejante a como ocurre en los bóvidos (MATHIAS, 1987). El ganado caprino puede contagiarse vía digestiva, por la alimentación con leche de vacas infectadas (DAVENAS y DABRIGEON, 1955). Si bien G. PALLASKE (1961) la cita como una vía rara de infección en esta especie. Los ciervos de granja infectados por *M.bovis* pueden contagiar al hombre (FANNING y EDWARDS, 1991)

Las infecciones debidas a *M.avium* suelen producirse vía digestiva (LESSLIE y cols., 1960; MATHIAS, 1987). El contagio se produce a partir de patos de granjas u otras aves enfermas próximas a las explotaciones caprinas (LESSLIE y cols., 1960; EDINGTON, 1989; ANDERSEN y KING, 1993) o por mamíferos salvajes infectados por *M.avium complex* (ANDERSEN y KING, 1993).

G. PERRIN y cols. (1984) y VAN DER HEERVER (1984), comentan la fuerte controversia que existe en cuanto a como se trasmite la tuberculosis de cabra a cabra.

Se ha demostrado la transmisión de *M.bovis* del hombre al ganado vacuno (LESSLIE, 1968 y LEPPER y CORNER, 1983). Aunque la infección por lo general ocurre vía respiratoria, varios casos de infecciones cruzadas hombre-animal por *M.bovis* resultaron de la práctica por parte de los cuidadores del ganado, de orinar

en el heno, con objeto de aumentar su contenido en sales, dando lugar en el hombre a una tuberculosis renal (BENET, 1990). También se dan casos de transmisión de *M.bovis* al hombre por inhalación de partículas infecciosas procedentes de animales enfermos (BENET, 1990; FANNIG y EDWARDS, 1991), pero el modo principal de contagio en el hombre es por el consumo de leche cruda o insuficientemente hervida (BENET, 1990). *M.bovis* en ganado bovino se disemina por aerosoles (FRANCIS, 1958; KLEEBURG, 1975). La infección puede ocurrir vía digestiva o incluso genital (FRANCIS, 1958 y THOEN y KARLSON, 1978).

Los perros y gatos pueden contagiarse a partir del consumo de leche cruda procedente de vacunos infectados, cerdos, cabras y ovejas por vivir en estrecho contacto en lugares cerrados con ganado vacuno infectado (THOEN y cols., 1984). El hombre puede mantener la infección de *M.bovis* en ausencia de reservorio animal, por contagio interhumano y contagiar al animal (BENET, 1990). El hombre se puede contagiar de *M.bovis* bien a partir de alimentos contaminados o por vivir en un medio rural en el que tienen contactos frecuentes con bovinos infectados (CORRÊA y CORRÊA, 1974). Los veterinarios son profesionales en riesgo de contraer la tuberculosis (KUBIN y cols., 1984). Los bovinos representan un callejón sin salida de *M.tuberculosis*, en la medida en que *M.tuberculosis* produce solo una infección inaparente, manifiesta por una reacción alérgica (BENET, 1990). En la infección natural en ganado por *M.bovis* la excreción comienza aproximadamente a los 87 días post-infección (NEIL y cols., 1991).

4.- PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE DE LAS MICOBACTERIOSIS

La hipersensibilidad de tipo retardado en la tuberculosis se puede definir como un proceso que destruye los macrófagos no activados en cuyo interior se multiplican los bacilos tuberculosos. De la misma forma la inmunidad celular se puede definir como un proceso que activa los macrófagos de forma que pueden destruir y digerir los bacilos que fagocitan. Ambas repuestas pueden interrumpir la multiplicación de bacilos tuberculosos, debido a que los macrófagos muertos que constituyen el principal componente del tejido necrótico caseoso sólido, no produce un crecimiento bacteriano apreciable. La principal diferencia entre hipersensibilidad retardada y la inmunidad celular radica en el hecho de que la primera de ellas destruye los macrófagos inactivados cargados de bacilos

mientras que la segunda intensifica la capacidad de los macrófagos para destruir los bacilos que fagocitan. En la hipersensibilidad retardada los bacilos son inhibidos en el tejido extracelular, en el tejido necrótico. En la inmunidad celular los bacilos se destruyen a nivel intracelular, en el interior de los macrófagos activados. La hipersensibilidad retardada con frecuencia da lesiones en el tejido del huésped, especialmente cuando son muy elevadas las concentraciones locales de antígenos de tipo tuberculino. Por lo que esta hipersensibilidad constituye un poderoso mecanismo para controlar el número de bacilos tuberculosos, no produce una erradicación de los mismos, pero crea un ambiente extracelular desfavorable en el cual mueren muchos de ellos. La lesión pulmonar en la tuberculosis clínica parece ser debida casi exclusivamente a un mecanismo de hipersensibilidad retardada (DANNENBERG, 1993).

4.1.- DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD

M. bovis y *M. tuberculosis* no poseen exotoxinas, cápsula, ni enzimas extracelulares importantes que expliquen su virulencia. Contiene una gran cantidad de material lipídico superficial. De estos lípidos de superficie, la 6,6'-dimicoliltrehalosa ha sido aislado y denominado "factor cordón", debido a que su presencia hace que el microorganismo crezca en forma de cordón en el cultivo líquido. Este factor cordón es abundante en las cepas virulentas y su eliminación las convierte en avirulentas. Este factor cordón parece contribuir en la virulencia, pero no es el único factor involucrado (GILESPIE y TIMONEY, 1983; HERNANDEZ y DUBON 1992; HERMOSO y CARDENAL, 1992). Además de poseer propiedades leucotóxicas, inhibe el quimiotactismo leucocitario, induce a la respuesta granulomatosa, desintegra el retículo endoplásmico rugoso, y determina trastornos en la respiración celular al actuar sobre las mitocondrias de la célula hospedadora (GOREN, 1982; TAKAYAMA y QURESHI, 1984; THOEN y cols., 1988). Los sulfolípidos potencian la toxicidad del factor cordón sobre las mitocondrias inhibiendo la fosforilación oxidativa, a la vez que inhiben la fusión lisosomafagosoma (KATO y GOREN, 1974; THOEN y cols., 1988; HERNANDEZ y DUBON, 1992). Estudios hechos al microscopio electrónico muestran cómo los bacilos pueden viajar intactos e incluso multiplicarse en el fagosoma (THOEN y cols. 1988).

La trehalosa contenida en los polisacáridos de la pared celular induce la respuesta inmune (THOEN y cols. 1988)

Las formas L de *M.bovis* carecen de poder patógeno para el ganado vacuno. Estas formas L revierten a formas típicas tras tres pases por medio de Löwenstein Jensen (ASTASHOVA y KADOCHKIN, 1989).

4.2.- FASES PATOGENICAS DE LA TUBERCULOSIS

LURIE (1964), estableció dos modelos animales en conejos, uno de conejos sensibles y el otro de conejos resistentes. Los lactantes recién nacidos y los pacientes inmunodeprimidos presentan una forma de tuberculosis semejante a la desarrollada por los conejos del modelo sensible de Lurie y los adultos inmunocompetentes similar al modelo resistente. Estos dos modelos sobre conejos nos capacita para definir las cinco fases de la tuberculosis pulmonar, empezando por la infección inicial de los macrófagos y finalizando con la formación de cavidades (DANNENBERG, 1993).

Fase I. Cuando la infección es debida a *M.bovis* o *M.tuberculosis* la vía de entrada suele ser la respiratoria. La limpieza realizada por el moco y el epitelio ciliar de las vías respiratorias altas defienden de la infección por inhalación de las micobacterias. La medida de un bronquio terminal es de 20 μm comparado con la de una micobacteria que es de 1-4 μm La micobacteria pasa a los alveolos y es captada por los macrófagos alveolares (THOEN y cols, 1988, THOEN y HIMES, 1988).

Tras la inhalación la mayoría de los bacilos tuberculosos son destruidos o inhibidos por los macrófagos alveolares en los conejos resistentes, mientras que en los conejos susceptibles la destrucción es menor. Los macrófagos alveolares parecen estar activados en los dos modelos pero con una mayor intensidad en los conejos resistentes, destruyendo más del 90 % de los bacilos tuberculosos inhalados (LURIE, 1964). Los macrófagos alveolares de todas las especies de mamíferos parecen muy activos, probablemente debido a una estimulación inespecífica producida por partículas de polvo y microbianas fagocitadas por ellos mismos (DANNENBERG, 1993).

Los neutrófilos entran en las zonas de la infección. Los macrófagos activados son considerados como la protección más importante del hospedador en la patogénesis de las micobacteriosis. Los macrófagos pueden ser activados después del encuentro con un organismo ácido resistente o resultar como una estimulación de

productos de los linfocitos. Los macrófagos presentan los antígenos micobacteriales a los linfocitos T, los cuales se consideran la llave de reconocimiento en la respuesta inmune a las micobacteriosis. La interacción de los linfocitos con los antígenos específicos hace que se liberen sustancias solubles (linfocinas) que atraen, activan y aumentan el número de mononucleares en el lugar de la infección. Los linfocitos sensibilizados son detectados en ganado porcino y bovino a las dos semanas después de la exposición subcutánea a *M.bovis* o *M.avium*, y la respuesta específica a los antígenos micobacterianos es detectada a las seis semanas post-exposición (THOEN y cols. 1988).

Los macrófagos del huésped fagocitan con facilidad a *M.tuberculosis*, pero la micobacteria previene la fusión de los lisosomas celulares con el fagosoma y, de esta manera evita la digestión intracelular y su destrucción, lo que puede constituir un factor de mayor virulencia para *M.tuberculosis* (GILLESPIE y TIMONEY, 1983).

En la tuberculosis pulmonar cuando los bacilos no son destruidos por los macrófagos alveolares, entramos en la fase II de la tuberculosis (DANNENBERG, 1991).

Fase II. Los bacilos tuberculosos no destruidos por los macrófagos alveolares se multiplican a nivel intracelular y son liberados cuando se destruyen los macrófagos. Los bacilos liberados atraen por mecanismos quimiotácticos a monocitos y macrófagos inactivados del torrente sanguíneo, formándose de esta manera un tubérculo primario inicial. Las vacuolas fagocíticas en el citoplasma de estos macrófagos inactivados parecen constituir un ambiente ideal para la multiplicación de los bacilos, que se produce de forma logarítmica a la misma velocidad tanto en conejos sensibles como resistentes. Es una fase simbiótica, en la que los bacilos se están multiplicando y los macrófagos acumulan bacilos, de manera que los bacilos no destruyen los macrófagos y viceversa (LURIE, 1964 y DANNENBERG, 1991). En la tuberculosis por *M.bovis* inicialmente se produce una destrucción celular o necrosis. La micobacteria se multiplica en el interior de los macrófagos y 10-14 días después se desarrolla hipersensibilidad (THOEN y cols, 1988).

Fase III. Al cabo de 2 ó 3 semanas se desarrolla tanto la hipersensibilidad de tipo retardado como la inmunidad celular, se observan ovillos de bacilos tuberculosos que crecen de forma simbiótica en macrófagos inactivados. En muchos de estos

macrófagos los bacilos son demasiado numerosos como para ser destruidos por el proceso de inmunidad celular. Únicamente la hipersensibilidad de tipo retardado puede interrumpir el crecimiento logarítmico al destruir los macrófagos cargados de bacilos. Esta destrucción da lugar a la formación del centro caseoso del tubérculo. Los bacilos son incapaces de multiplicarse en el tejido caseoso sólido (necrótico) debido a que carece de oxígeno, su pH es excesivamente ácido, a la presencia de ácidos grasos tóxicos y probablemente a otros factores desconocidos. En este tejido caseoso se destruyen algunos bacilos mientras que otros pueden permanecer en fase quiescente durante muchos años, incluso durante toda la vida .

La multiplicación logarítmica de los bacilos se interrumpe al mismo tiempo en los conejos resistentes que en los sensibles, debido a que en ambos se desarrolla una fuerte sensibilidad tuberculínica a través de un mecanismo de hipersensibilidad retardada. Los conejos resistentes presentan un sistema inmunitario más eficaz, mientras que los sensibles contienen un número de bacilos veinte y treinta veces superior y por tanto presenta una mayor estimulación inmunológica producida por los antígenos de tipo tuberculínico segregados o liberados por las micobacterias (LURIE, 1964 y DANNENBERG, 1991).

Los macrófagos del hospedador tienen aumentada la capacidad de matar bacilos intracelulares. La respuesta de hipersensibilidad es mediada por linfocitos, los cuales producen linfocinas. Esta sustancia atrae y activa células mononucleares de la sangre hacia el lugar de infección donde existen micobacterias virulentas o sus productos (THOEN y cols., 1988).

Fase IV. Al cabo de tres semanas, la multiplicación de los bacilos en los tubérculos caseosos es controlada con la misma eficacia en los conejos sensibles que en los resistentes. En ambos la curva de crecimiento bacilar es plana. No obstante, esto ocurre de manera distinta en los conejos sensibles que en los resistentes, por lo que Lurie define una fase IVa desarrollada por los conejos sensibles y una fase IVb por los resistentes.

Fase IVa. se presenta únicamente una inmunidad celular de carácter débil. Los bacilos tuberculosos liberados del centro caseoso son ingeridos por macrófagos relativamente inmunocompetentes, y los conejos continúan utilizando el mecanismo de hipersensibilidad retardada para interrumpir la multiplicación intracelular de los bacilos. El centro caseoso aumenta de tamaño y se produce una

destrucción local del tejido pulmonar. En los casos en los que nunca se desarrollan macrófagos altamente activados que pueden destruir a los bacilos tuberculosos intracelulares, esta secuencia se repite en muchas ocasiones. El pulmón queda destruido y los bacilos se diseminan a través de vasos linfáticos y sanguíneos hacia otras localizaciones, donde continúa la destrucción tisular (LURIE, 1964). Este patrón de tuberculosis se presenta en pacientes y vacunos inmunodeprimidos (DANNENBERG, 1991 y 1993; THOEN y HIMES, 1988).

La hipersensibilidad desarrollada contribuye a la muerte celular y destrucción de los tejidos (necrosis caseosa). En algunos instantes se produce licuefacción y formación de cavidades, debida a la acción enzimática. La ruptura de estas cavidades hacia el interior de los bronquios da lugar a aerosoles con bacilos. Los macrófagos activados van a los vasos linfáticos de los ganglios linfáticos torácicos, bronquiales y mediastínicos. Ultraestructuralmente los macrófagos muestran un alargamiento y un aumento en el número de lisosomas, complejo de Golgi y vesículas. Los ganglios linfáticos son más frecuentemente infectados que otros tejidos porque los fluidos del animal pasan eventualmente a través de los nódulos en donde las trabéculas atrapan a los microorganismos. El aumento y la presencia de macrófagos en pasajes impenetrables entre células reticulares de los ganglios promueve el desarrollo del crecimiento de las micobacterias y desarrollo de lesiones granulomatosas en los ganglios, a veces alguna micobacteria fagocitada queda en el pulmón, y ambos, pulmón y ganglio son afectados. Una lesión pequeña, puede regresar y ser encapsulada por células y tejido conectivo, estas lesiones pueden contener bacilos viables. Típicamente, la apariencia microscópica de un granuloma (tubérculo), es focal y tiene en el área central una necrosis caseosa rodeada por células epitelioides, linfocitos y granulocitos, puede observarse mineralización en el centro de necrosis y en lesiones más avanzadas focos de mineralización por coalescencia. Células multinucleares se observan en áreas cercanas a la zona de necrosis (THOEN y cols., 1977).

Fase IVb. Se produce en los conejos resistentes que presentan una intensa inmunidad celular. Los bacilos tuberculosos liberados a partir del centro caseoso son ingeridos por macrófagos competentes. Estos macrófagos son activados por gamma interferón y otras linfocinas liberadas por linfocitos con actividad antigénica. Alrededor del centro caseoso se acumula un manto de estos macrófagos altamente activados, de manera que los bacilos que

escapan de los bordes de la zona caseosa son ingeridos y destruidos y no se produce una mayor destrucción tisular.

Tanto los conejos resistentes como los sensibles presentan intensa reacción de hipersensibilidad retardada pues ambos grupos de conejos muestran necrosis caseosa, aunque los susceptibles en mayor cantidad. Únicamente los conejos resistentes producen un gran número de macrófagos altamente activados (células epitelioides maduras) que pueden destruir con facilidad los bacilos tuberculosos que fagocitan. En los conejos resistentes, cuando no se produce una licuefacción del centro caseoso la enfermedad puede ser detenida por la inmunidad celular debido a que no se produce una mayor destrucción tisular (LURIE, 1964). Este contexto se observa en pacientes inmunocompetentes que presentan positividad en las reacciones tuberculínicas y en quienes no existe evidencia clínica de la enfermedad (DANNENBERG, 1991 y 1993).

Fase V. Lamentablemente la hipersensibilidad retardada se asocia a la licuefacción del foco caseoso sólido. En el material caseoso licuefactado los bacilos vuelven a encontrar un ambiente favorable y se multiplican profusamente por primera vez a nivel extracelular. La elevada dosis de antígenos bacilares da lugar a una intensa destrucción tisular secundaria a la reacción de hipersensibilidad retardada. Se produce una erosión de los bronquios adyacentes, seguida por la formación de cavidades, incluso existiendo una inmunidad celular muy desarrollada no se puede con frecuencia superar el gran número de bacilos con sus productos de tipo tuberculino, que se diseminan a través del árbol bronquial a otras zonas de los pulmones extendiendo la enfermedad y dando lugar en ocasiones a una bronconeumonía caseosa con muerte del paciente. A través de la misma vía bronquial los bacilos pueden alcanzar el ambiente externo y pueden infectar a otros individuos (LURIE, 1964). Desde el punto de vista clínico estas fases no se producen de forma ordenada como en los conejos de Lurie (DANNENBERG, 1991 y 1993).

Para que una inflamación sea crónica, la irritación debe persistir, pero relativamente se sabe poco acerca de antígenos persistentes o inmunocomplejos como estimulantes de una inflamación crónica. La técnica PAP (peroxidasa- antiperoxidasa), es capaz de detectar antígenos persistentes. Con ella se demostró que el aislamiento de las micobacterias dentro de los macrófagos persiste más tiempo que sus polisacáridos, los cuales a su vez persisten más que sus componentes proteicos. Los linfocitos y las linfocinas

actúan como agentes irritantes persistentes, bien directa o indirectamente, y hacen que los macrófagos liberen hidrolasas, incluyendo colagenasa, que perpetúan la inflamación. Estas hidrolasas son producidas también por autólisis. La Catepsina D se encuentra mediante técnicas histoquímicas adherida al tejido necrótico y continua activa pocos días después de la muerte celular. Los macrófagos llegan al torrente circulatorio y se dividen varias veces, cosa que es infrecuente en los macrófagos viejos. En la lesión tuberculosa los macrófagos son reemplazados cada 7-10 días. Algunos macrófagos que entran en la lesión se diferencian en células ricas en enzimas hidrolíticas, y otras se diferencian en macrófagos secretores (DANNENBERG y HIGUCHI (1979)).

Clásicamente la patogenia de la tuberculosis por *M. bovis* en ganado bovino sigue el siguiente esquema patogénico (MATHIAS, 1987):

- 1.- Asentamiento del bacilo constituyendo el foco primario.
- 2.- Localización primaria y afección del ganglio linfático regional más cercano, constituyendo el complejo primario, el cual puede resultar completo o incompleto.
- 3.- Encapsulamiento del foco primario. pudiendo ocurrir:
 - 3.1.- detención del proceso, mediante encapsulamiento, con organización del foco caseificado y calcificación consiguiente.
 - 3.2.- si las defensas resultan insuficientes, la infección se extiende a partir del foco primario a otros órganos produciéndose una generalización precoz, la cual se produce vía linfática, y posteriormente vía hematogena y linfohematogena. Allí donde se asienta la micobacteria se forman nuevos focos tuberculosos:
 - tuberculosis miliar: todos los tubérculos miden aproximadamente lo mismo.
 - generalización lenta: los tubérculos presentan distintas edades.
- 4.- Reinfeción o post-infección:

Se conoce como tuberculosis del período post-primario. Se caracteriza porque faltan las alteraciones en los ganglios regionales más cercanos, ya que la difusión se realiza intracanalicular, dando lugar a la tuberculosis orgánica crónica. Si se produce un derrumbamiento de las defensas habrá una rápida difusión de la bacteria (bacteriemia), dando lugar a una tuberculosis galopante que se vuelve a acompañar de la afección de los ganglios satélites, y constituyéndose nuevos focos miliares en otros órganos (generalización tardía) (MATHIAS, 1987).

En el visón se produce generalización aguda con tuberculosis miliar diseminada, y generalización tardía (HEJLIEK y cols., 1973).

Las infecciones por *M. avium* normalmente se adquieren vía digestiva tanto en vacuno como en porcino. La infección se produce por ingestión. En bovino la infección de las tonsilas es rara, quizás por su localización subepitelial y debido a que no tienen vasos linfáticos aferentes. Los ganglios que se suelen ver implicados son: el ganglio retrofaríngeo medial que reciben los vasos aferentes del suelo de la boca y partes adyacentes, otros nódulos linfáticos de la cabeza (mandibular, parotídeo y retrofaríngeo lateral) se encuentran ocasionalmente involucrados (THOEN y cols., 1977). Los hepáticos y abomasales se encuentran frecuentemente afectados. Debido a las comunicaciones existentes entre el hígado y el duodeno las micobacterias pueden pasar desde el duodeno a los ganglios hepáticos. Ocasionalmente, sólo los ganglios mesentéricos pueden estar afectados. La localización de tubérculos en las membranas mucosas del intestino delgado no ha sido comunicada. Aparentemente las micobacterias se difunden en el interior de la lámina propia y son transportadas por fagocitos a los vasos linfáticos y a los ganglios mesentéricos. Los ganglios poplíteos e ilíacos pueden presentar lesiones, pero no es común. También se han encontrado tubérculos en la piel prepucial y ganglios regionales por C.O. THOEN y cols., (1977).

4.3.- DIFERENCIAS PATOGENICAS EN EL GANADO CAPRINO

La tuberculosis caprina es una enfermedad de evolución rápida (SCHELISSER, 1977) que pronto entra en fase de generalización con diseminación de la micobacteria vía linfohematógena, y que en los animales en lactación puede ser eliminada por la leche (LESSLIE y cols., 1960).

A. BERNABE y cols (1990-91A) describen distintas fases patogénicas en la tuberculosis caprina por *M. bovis*: fase de primoinfección con: complejo primario, generalización precoz (esta presenta distintas formas: tuberculosis miliar, tuberculosis precoz y lenta, tuberculosis de grandes nódulos y tuberculosis de serosas). Fase post-primaria con tuberculosis orgánica crónica (tuberculosis acino nodular, cavernas y úlceras en tráquea y bronquios. Fase de generalización tardía con neumonía tuberculosa lobular caseificante, con diseminación miliar en pulmón y riñón.

M.A. GOMEZ y cols.(1992), observaron de 75 animales tuberculino positivos 19 casos en fase de primoinfección dentro del complejo primario, 12 como generalización precoz (con difusión orgánica por vía linfohemática), 36 en fase de orgánica-crónica (con diseminación intracanalicular y con exteriorización del caseum vía aerógena y digestiva tras la deglución de dicho material) y ocho en fase de generalización tardía (con diseminación vía linfohematógena, y eliminación a través de la glándula mamaria y vía aerógena). Además, el 45 p.100 presentaban un proceso mixto tuberculosis paratuberculosis.

A.VERA y cols. (1989) observan casos de tuberculosis caprina por *M.tuberculosis* en la que se da un proceso de generalización precoz con presentación de tuberculosis miliar y perlada. Estos procesos de generalización son también descritos por **G.M. ALLEN y cols. (1987)**; **J. MURKHERJEE y cols.(1992)**.

5.- CLINICA

5.1.- CLINICA EN EL GANADO CAPRINO

Se caracteriza por tener una evolución lenta y progresiva (**EDINGTON, 1989, LUKE, 1958**).

Los síntomas más significativos y no patognomónicos consisten en una pequeña pérdida de la producción de leche pero persistente, y en un adelgazamiento progresivo con pérdida del apetito que conduce a una caquexia acentuada y a la muerte. Existe retraso y detención del crecimiento de los animales jóvenes. Cuando la infección es producida por *M.bovis*, los síntomas principales residen en el aparato respiratorio, en el pulmón aparecen fenómenos de afección pulmonar lenta pero progresiva con hipertrofia. La evolución es a menudo larga y se caracteriza por fases sucesivas de estabilización y reactivación de la enfermedad (**MILNE, 1955; SCHLIESSER y cols., 1969; DE LA HAYE, 1983, PERRIN y cols., 1984; BEER, 1987; FUENTES, 1987; GILLESPIE y TIMONEY, 1983**).

La evolución en animales jóvenes (menos de 18 meses) es más rápida cursando en un período de 2 a 3 meses.

El período inicial es caracterizado por: tos persistente y

espontánea, ronca y profunda (THOREL, 1984; PERRIN y cols., 1984; FUENTES, 1987). Aparecen signos de traqueobronquitis y posteriormente de bronconeumonía. El estado general está alterado y el animal adelgaza. Aparece moco a veces sanguinolento y existe polipnea. A la percusión se manifiesta submatidez difusa, a la auscultación aparecen ruidos respiratorios. Cuando hay localización cardíaca se produce una alteración de la frecuencia y arritmia (PERRIN y cols., 1984).

A veces los ganglios preescapulares e inguinales, están hipertrofiados, sobre todo cuando la infección radica en la mama que aparece dura y sin leche, transformada en un tumor duro, indoloro y tuberoso, de tamaño variable, llegando a veces hasta el tamaño de una cabeza humana. La leche es de aspecto normal, al contrario de lo que sucede en otros procesos inflamatorios de la mama (FUENTES, 1987). La tuberculosis mamaria por *M.bovis* en ganado caprino, al igual que en el vacuno, se acompaña de hipertrofia de los ganglios retromamarios (MATHIAS, 1987 y THOREL, 1984). También *M.tuberculosis* puede producir mamitis en esta especie (JOUBERT, 1973).

La infección es compatible durante un largo tiempo con un buen estado general del animal (PERRIN y cols., 1984 y THOREL, 1984).

Las cabras infectadas por *M.avium* desarrollan infecciones intestinales (SOLIMAN y cols., 1953; MATHIAS, 1987; GILESPIE y TIMONEY, 1983; ANDERSON y KING, 1993), que se manifiestan clínicamente con anorexia y diarrea crónica, resultando en una caquexia acompañada de un cuadro de anemia e hiperproteinemia (ANDERSON y KING, 1993). No existe ningún síntoma específico, y estos dependen del grado de extensión de las lesiones. Cuando se afectan los ganglios retrofaríngeos, preescapular o mamario estos se encuentran aumentados de tamaño, duros y generalmente indoloros a la palpación (PERRIN y cols., 1984)

Los síntomas más llamativos de la clínica de *M.tuberculosis* en chivos son: adelgazamiento, inapetencia y una diarrea severa (SOLIMAN y cols., 1953), también puede dar lugar a una nefritis crónica con todo su cuadro sintomático (MURHERJEE y cols, 1992).

5.2.- CLINICA DE LA ENFERMEDAD EN OTRAS ESPECIES ANIMALES

VACUNO

La tuberculosis en el ganado vacuno suele cursar de forma lenta y progresiva. Normalmente localizada en pulmón, acompañándose de síntomas respiratorios (MATHIAS, 1987).

Cuando *M.bovis* se localiza en la mama el cuadro clínico es similar al descrito en el caprino (PERRIN y cols., 1984, MATHIAS, 1987; OKOLO, 1992). No obstante, I.N. KANTOR y cols. (1987) observan como única lesión tuberculosa en la mama áreas de congestión hemorrágicas en un gran número de animales.

J.C. GOMEZ y cols., (1987) describen un caso de meningoencefalitis en ternero, con sintomatología propia de una meningitis inespecífica.

Solamente en las formas agudas o hiperagudas de tuberculosis se observan cambios hematológicos caracterizados por leucopenia con linfopenia. En algunos casos agudos se observa bacteriemia (LEPPER y cols., 1977).

CABALLO

La enfermedad por *M.bovis* cursa normalmente de forma crónica. Lo primero que se observa es una menor aptitud para el trabajo, a pesar de que el apetito es normal. Rigidez del cuello que se desarrolla en una gran proporción de casos. Frecuentemente se produce poliuria. Aparecen trastornos respiratorios, siendo el síntoma más destacado la tos, en algunos casos destilación nasal cremosa bilateral, acompañada o no de tumefacción e induración de los ganglios submaxilares. Un síndrome febril esta presente en los casos de tuberculosis miliar afectando al pulmón. (M'FADYEAN, 1924, STABLEFORTH, 1929, HUTYRA y cols, 1938, FRASER, 1949, WINKUP, 1942, INNES AND WILKINS, 1949; todos cit. LUKE, 1958). No obstante, suele ser *M.avium complex* el agente más citado como causante de tuberculosis equina, produciendo cuadros de inflamación de bolsas guturales (SILLS y cols., 1990), neumonía crónica (ANZAI y cols., 1989) y enterocolitis crónica (BUERGELT y cols, 1988).

CERDO

Generalmente *M. bovis* en el cerdo produce una enfermedad más severa y más diseminada que otras especies de bacilos tuberculosos (TOPLEY y WILSON, 1955 cit. LUKE, 1958). *M. avium* produce una enfermedad más localizada principalmente afectando a ganglios linfáticos. El cerdo resulta más resistente a la infección por *M. tuberculosis*, y, normalmente, sólo se produce una adenitis localizada (LUKE, 1958). A.J. FLETWOOD y cols (1988), describen casos de infarto ganglionar por *M. bovis*.

En otras especies, como el hombre (CORRÊA y CORRÊA, 1974; KUBIN y cols., 1984; BENET, 1990) y ovinos (LUKE, 1958) *M. bovis* se multiplica a nivel respiratorio, afectando al pulmón y a los ganglios regionales, así, los síntomas dependerán del grado de afección de los mismos.

6.-LESIONES

6.1.- LESIONES EN GANADO CAPRINO

6.1.1.- Lesiones por *M. bovis*

Las lesiones en general presentan el mismo aspecto que las que se presentan en ganado vacuno (ALLEN y cols., 1987; FILLET, 1989). Predominan las reacciones exudativas con tendencia a la caseificación (SCHLIESSER, 1973). Si bien D.V. COUSINS y cols. (1993) describen un estudio realizado sobre 19 cabras que no mostraban lesiones macroscópicas y de las que se aisló *M. bovis*. M.M. GUTIERREZ y cols. (1993) y S.O. ALAKU y MORUPPA (1993) afirman que el pulmón es el órgano más frecuentemente afectado en la tuberculosis caprina.

6.1.1.1.- Macroscópicas

Ganglios linfáticos superficiales

Los ganglios linfáticos retrofaríngeos, preescapular y subilíaco

están aumentados de tamaño y al corte rezuman líquido claro. En otras ocasiones masas caseosas con aspecto pastoso que chirrían al corte (BERNABE y cols., 1990-91 B). G.M. ALLEN y cols. (1987), observan afección de los ganglios de la cabeza.

Pulmón y pleura

El pulmón es el órgano principalmente afectado (ALLEN y cols., 1987), observándose lesiones encapsuladas con caseum amarillento en su interior.

Pueden presentarse las siguientes formas:

- Formaciones nodulares de 0.3-0.4cm. de coloración blanco amarillenta, distribuidas por todo el órgano que chirrían al corte conteniendo material pastoso de color blanco-amarillento.
- Formaciones nodulares del tamaño de un garbanzo al de una nuez, localizadas en las zonas más ventiladas del pulmón, con características similares a las anteriores.
- Formaciones nodulares de grandes dimensiones, del tamaño de un puño, en escaso número, de localización similar a la anterior, y que pueden o no afectar a los bronquios y contener material caseoso, en algunos casos líquido y de coloración blanco grisácea.
- Formaciones cavernosas sin contenido en su interior (BERNABE y cols., 1990-91B) . M.F. THOREL (1984) cita estas formaciones cavernosas repletas de caseum.
- Ulceras o soluciones de continuidad en tráquea y bronquios (BERNABE y cols 1990-91 B). Lesiones caseosas localizadas en los lóbulos apicales de los pulmones, diafragmáticos y cardíacos (MILNE, 1955; PERRIN y cols.1984).

El caseum encontrado puede presentar dos aspectos: un caseum seco y blanquecino propio de lesiones antiguas o caseum de aspecto untuoso y amarillento en las lesiones más recientes (PERRIN y cols.,1984).

Areas lobulillares de coloración blanco amarillenta con engrosamiento de los tabiques interlobulillares que ocupan las

porciones más basales de los lóbulos apicales y principales. Es frecuente encontrar distintas formas en un mismo animal. En pleura se pueden observar formaciones nodulares así como placas de coloración blanco-amarillenta subpleural (BERNABE y cols., 1990-91 B).

Ganglios mediastínicos

Las lesiones dependen del grado de evolución, observándose calcificación en los más antiguos (THOREL, 1984) y abscesos de coloración blanco-amarillenta y consistencia firme (MILNE, 1955; ALLEN y cols., 1987; ASHRAF y KHAN, 1989).

Presencia de nódulos de pequeño tamaño en superficie de 0,1-0,5 cm. de diámetro, o en profundidad que hacen que el ganglio se encuentre aumentado de tamaño y brillante. Estos nódulos pueden confluir para dar lugar a formaciones de mayores dimensiones y presentan un contenido pastoso que chirría al corte. Se han observado también granulomas en serosas (BERNABE y cols., 1990-91 A).

Bazo, hígado e intestino

En el bazo es frecuente encontrar formaciones nodulares de distintas dimensiones, que al corte chirrían, y con contenido pastoso, seco y de coloración blanco-amarillenta. En la cápsula se han observado sobrecrecimientos vellosos. En el hígado nódulos miliares diseminados por todo el órgano o nódulos de mayores dimensiones, rodeados de cápsula conectiva y contenido amarillento y pastoso. En intestino las lesiones macroscópicas encontradas han sido: aumento focal del diámetro del cilindro intestinal, a modo de dilatación saculiforme. Al corte la mucosa está engrosada y de tonalidad rojiza y soluciones de continuidad con material blanquecino y pastoso. Nódulos blanco grisáceos y brillantes de distintos tamaños que hacen prominencia en la luz luminal del intestino delgado. En el ciego nódulos del tamaño del grano de mijo, de coloración blanquecina que chirrían al corte y contenido pastoso-amarillento. La lesión macroscópica no siempre se presenta aún poniéndose en evidencia la microscópica (BERNABE y cols., 1990-91B).

Ganglios linfáticos mesentéricos

Se presentan irregularmente aumentados de tamaño, con nodulaciones de color blanquecino o blanco-amarillentas que chirrían al corte (BERNABE y cols., 1990-91B). A.H. MILNE (1955) describe afección de ganglios mesentéricos en un caso de generalización por *M.bovis* quedando el resto de los casos por *M.bovis* localizados en aparato respiratorio. También M.F. THOREL (1984) encuentra algunos casos en los que los ganglios mesentéricos están afectados.

Corazón, diafragma y riñón

En epicardio nodulaciones que profundizan en miocardio, de tamaño pequeño y de coloración blanco grisácea, y otras nodulaciones que hacen prominencia sobre la cavidad pericárdica, también de pequeño tamaño, y que a veces confluyen dando lugar a focos o placas de mayores dimensiones. Este último tipo puede aparecer también en pericardio parietal. Las lesiones en diafragma son poco frecuentes y pueden afectar tanto a la cara parietal como visceral. Son lesiones de tipo proliferativo como las que se presentan en serosas. En el riñón no han sido observadas aunque sí existe lesión microscópica (BERNABE y cols., 1990-91B).

6.1.1.2.- Microscópicas

El examen microscópico de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina revela la existencia de granulomas tuberculosos que, con la técnica de Ziehl-Neelsen pone en evidencia bacilos alcohol-ácido-resistentes en el interior de células epitelioides y células gigantes multinucleadas tipo Langhans (ALLEN y cols., 1987; ASHRAF y KHAN, 1989; BERNABE y cols., 1990-91A). G. PERRIN y cols (1960) describen granulomas miliares con células de Langhans junto con procesos de caseificación y calcificación. Aunque M.F. THOREL (1984) afirma que la calcificación es rara en esta especie.

En pulmón, tanto en células epitelioides como en material caseoso se encuentran gran número de formas bacterianas aisladas

o agrupadas. Esto también se ha confirmado en ganglio linfático mediastínico.

A. BERNABE y cols. (1990-91B) describen en pulmón y pleura tres tipos de lesiones:

- formas preferentemente proliferativas tipo nodular o vellosa: se caracteriza por la presencia de granulomas de pequeño tamaño con escasas áreas de necrosis central por caseificación secundaria, calcificados y rodeados de células epitelioides, algunas células tipo Langhans, linfocitos y cápsula conectiva. Las formaciones vellosas aparecen a modo de sobrecrecimientos papilares de fibroblastos y células epitelioides.

- formas proliferativo-exudativas, presentando grandes masas de necrosis por caseificación (con o sin áreas de calcificación) que aumenta de tamaño con la resorción de granulomas de menores dimensiones localizados periféricamente, y constituidos por un infiltrado difuso de células epitelioides, células Langhans y linfocitos, rodeados por zonas de coagulación plasmática intraalveolar. En zonas próximas a bronquios podría afectar a la pared de estos, dando lugar a grandes cavernas, y más tarde úlceras bronquiales, favoreciéndose la diseminación por vía intracanalicular.

- formas preferentemente exudativas que se caracterizan por áreas de necrosis por caseificación primaria, encontrándose áreas de parénquima pulmonar afectadas por zonas de necrosis sin calcificación y rodeadas difusamente por un infiltrado celular específico, a veces inespecífico, y por grandes áreas de coagulación plasmática. La acentuación de estos procesos puede afectar a las pleuras originando pleuritis caseosa.

En otros órganos **A. BERNABE y cols. (1990-91B)** describen las siguientes lesiones:

en los ganglios mediastínicos granulomas con centro de necrosis-calcificado, células epitelioides, Langhans, linfocitos y cápsula conectiva. También se han encontrado granulomas con caseificación primaria no acompañada de calcificación.

en el bazo han observado granulomas tuberculosos fibrocalcificados caracterizados por una zona central de caseificación y calcificación, rodeados de una cápsula conectiva, en algunas ocasiones incompleta o/y en otras muy engrosada, en algunas

ocasiones con depósito de sustancia amiloide.

en el hígado una forma parenquimatosa de tipo proliferativo formada por granulomas perfectamente constituidos, que pueden en ocasiones estar rodeadas por otros de menores dimensiones. Otra forma portal de tipo preferentemente proliferativo-exudativo, caracterizados por un infiltrado típico que más tarde sufre necrosis por caseificación y aparición en la luz de los colangiolo de masas de caseum parcialmente calcificadas.

en el intestino granulomas tuberculosos localizados en mucosa, submucosa y subserosa. En la mucosa consisten en un infiltrado de células epitelioides y algunas gigantes multinucleadas en la lámina propia que más tarde sufren procesos de caseificación que pueden dar lugar posteriormente a la destrucción de la lámina epitelial y a la formación de úlceras. Algunas veces los granulomas presentan una cápsula conectiva quedando perfectamente delimitados. En la submucosa, granulomas perfectamente constituidos y con centros parcialmente calcificados.

en los ganglios linfáticos mesentéricos granulomas tuberculosos bien delimitados y calcificados, rodeado de granulomas resortivos. A veces estos granulomas dan negativos a la tinción de Ziehl-Neelsen.

en el corazón granulomas perfectamente constituidos debajo del epicardio.

en el diafragma lesiones proliferativas nodulares y vellosas.

en el riñón lesiones subcapsulares de tipo proliferativo en ocasiones con otros granulomas resortivos (BERNABE y cols., 1990-91B).

6.1.2.- Lesiones por *M. avium*

Localizadas principalmente en órganos de la cavidad abdominal (LESSLIE y cols., 1960; ANDERSEN y KING, 1993). Enteritis aguda (LESSLIE y cols., 1960) Edema en íleon y colon (ANDERSEN y KING, 1993).

Los ganglios mesentéricos están alargados con lesiones caseosas y calcificadas. Se aprecian áreas con hemorragias petequiales (LESSLIE y cols., 1960) y edema (ANDERSEN y KING, 1993). Según J. EDINGTON (1989), es la principal localización de la tuberculosis caprina por *M. avium*.

Se describen también afección de ganglios mediastínicos, retrofaríngeos hepáticos e ileocecales con lesiones caseosas y áreas de calcificación (LESSLIE y cols., 1960).

En el hígado y bazo se encuentran nódulos fibrosos subcapsulares (LESSLIE y cols., 1960).

Histopatológicamente, los nódulos en ganglios mesentéricos e ileocecales corresponden a una infiltración de células epitelioides y células gigantes, con áreas de caseificación con centros de necrosis y centros de calcificación, rodeadas de tejido conectivo (LESSLIE y cols., 1960). En el bazo e hígado se encuentran áreas de proliferación de células epitelioides y gigantes pero no se observan bacilos ácido-resistentes en estos órganos (LESSLIE y cols., 1960). En los ganglios retrofaríngeos, infiltrado de células epitelioides (LESSLIE y cols., 1960). En las lesiones edematosas descritas por W.I. ANDERSEN y KING (1993) mediante la técnica de la hematoxilina-eosina se ponen de manifiesto bacilos Ziehl Neelsen positivos. La histopatología revela edema en submucosa del íleon y colon, mineralización en submucosa y mucosa de arterias y arteriolas, fibrosis multifocal con necrosis en Placas de Peyer.

6.1.3.- Lesiones por *M. tuberculosis*

El estómago y el bazo se presentan normales. En el hígado se describen focos necróticos con los ganglios hepáticos aumentados de tamaño. Inflamación en el intestino con úlceras e incluso hemorragias. El ciego y colon presentan inflamación pero no úlceras. Los ganglios mesentéricos agrandados, al corte presentan caseum en la zona central. Los riñones con focos necróticos en la corteza. Se pueden encontrar otros ganglios afectados en los que se observa aumento de tamaño y edema (faríngeos, hepáticos, ilíacos, mesentéricos, ileo-cecal, supramamario, submaxilar, bronquial y mediastínico (SOLIMAN y cols., 1953).

A. VERA y cols. (1989) describen algunas lesiones encontra

das en caprinos infectados por *M.tuberculosis*:

Macroscópicas: Pequeños nódulos de 0,2-0,4 cm. de coloración blanco amarillento sobre la superficie de la pleura del lóbulo principal izquierdo con adherencias papiliformes sobre la pared costal.

Microscópicas: Corresponden a lesiones proliferativas constituidas por pequeños granulomas con áreas de caseificación y calcificación rodeadas de células epitelioides, Langhans y linfocitos delimitados por una cápsula conectiva.

S. MUKHERJEE y cols. (1992) describen una nefritis tuberculosa en ganado caprino por *M.tuberculosis*, observándose en la superficie cortical del riñón nódulos de distintos tamaños de consistencia dura y color gris-amarillento y presencia de adherencias capsulares. Microscópicamente se observan áreas de necrosis en el tejido renal, formación de masas caseosas rodeadas por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, células gigantes, envuelto todo por tejido conectivo. Los más antiguos presentan depósitos de sales de calcio e infiltrado celular.

6.2.- LESIONES EN OTRAS ESPECIES

VACUNO

En las infecciones por *M.bovis* **M. RIVAS y cols.,(1985)** observan que es capaz de producir únicamente un complejo primario localizado en ganglios retrofaríngeos. **LISLE y cols.(1988)** observan que esta micobacteria puede ser aislada de distintas zonas del tracto respiratorio anterior, en las cabezas de animales tuberculino positivos, y aprecian que el foco primario de infección no está en esta región y que los microorganismos aislados desde secreciones nasales provenían del pulmón o tejidos asociados. **J.C. GOMEZ y cols. (1987)** describen un caso de meningoencefalitis tuberculosa en ternero observando a nivel del Sistema Nervioso Central abundantes nódulos asentados en las leptomeninges así como en tejido cerebral. Histológicamente granulomas típicos tuberculosos, fenómenos inflamatorios y hemorrágicos. Conjuntamente se observaban nódulos miliares en pulmón, parcialmente calcificados, las serosas de la cavidad torácica y abdominal presentaba nódulos

de color blanco-nacarado, constituyendo una tuberculosis perlada. El hígado y los ganglios regionales presentaban nódulos de gran tamaño. C.O. THOEN y cols. (1987) observan en un toro masas palpables de aproximadamente 6 cm. de diámetro localizado en la parte ventral del pene. En el prepucio, la lesión envolvía los nódulos linfáticos del mismo. Histológicamente se puso en evidencia linfocitos granulocitos, células epitelioides y células gigantes de Langhans rodeadas por tejido fibroso.

M. avium según C.O. THOEN y cols. (1981) induce lesiones en pulmón, riñones, hígado y ganglios bronquiales y mesentéricos difíciles de diferenciar de las producidas por *M. bovis*. Lesiones en riñón, hígado, y peritoneo (todas ellas no específicas). Las mismas lesiones son halladas por S.A. ALFREDSEN y cols. (1990) observando histopatológicamente células epitelioides, células gigantes y bacterias ácido resistentes

CABALLO

La lesión primaria normalmente está localizada en el abdomen y en algunos casos están confinadas en el tracto digestivo. Se pueden dar casos de generalización encontrándose lesiones miliares en el pulmón. Pueden encontrarse alteraciones en el esqueleto, principalmente localizadas en la región cervical. Los ganglios mesentéricos y el hígado están normalmente afectados. La mucosa intestinal puede mostrar úlceras a manera de cráteres y en pocos casos asociados a tuberculosis por *M. avium*, lesiones muy similares a las descritas en la enfermedad de Johne en el ganado vacuno. Las lesiones tienden a la cronicidad tomando la apariencia de neoplasias, particularmente vistas afectando a ganglios mesentéricos y bazo (M'FADYEAN, 1918 y LIENAU, 1925, todos cit. LUKE, 1958). Las lesiones por *M. bovis* en esta especie suelen ser de carácter productivo, no caseoso (SCHLIESSER, 1973).

Las lesiones observadas en tuberculosis por *M. avium complex* son: neumonía crónica con presencia de nódulos. Microscópicamente se corresponde con granulomas en cuyo interior destacan las células gigantes y los macrófagos (ANZAI y cols., 1989), enterocolitis crónica con linfadenopatía en ganglios mesentéricos, granulomas tuberculosos en hígado. Microscópicamente corresponden a una enteritis granulomatosa sin caseificación y necrotizante, linfadenitis granulomatosa sin mineralización y necrosis por

coagulación (BUERGELT y cols, 1988).

PORCINO

La mayoría de los casos de tuberculosis son diagnosticados en el matadero durante la inspección, aparentemente no causando ninguna alteración. Solamente una tumefacción de ganglios submaxilares y faríngeos, que en pocos casos contiene un pus fluctuante y caseoso (LUKE, 1958). En la mayoría de los casos es la vía oral la puerta de entrada de la tuberculosis en esta especie, y la generalización ocurre normalmente vía linfática. Los ganglios linfáticos frecuentemente implicados son los de la región faríngea, hepáticos, mesentéricos, y en casos de tuberculosis pulmonar los bronquiales y mediastínicos. Ciertamente existen diferencias entre las lesiones producidas por *M. bovis* y *M. avium*.

En la infección producida por el primero de ellos los ganglios están aumentados de tamaño con áreas de caseificación y calcificación. En el hígado se pueden encontrar tubérculos con centros de caseificación o calcificación, rodeados por una cápsula fibrosa. En el bazo las lesiones se proyectan hacia fuera del perfil del órgano y al seccionarlas encontramos un material blanco grisáceo. Focos miliares pueden encontrarse en el riñón. En el pulmón nódulos caseosos calcificados. Algunos casos de consolidación y formación de cavidades (LUKE, 1958). *M. avium* produce normalmente una tuberculosis digestiva. Se encuentran afectados los ganglios linfáticos, sin aparecer en ellos la típica lesión tuberculosa. Ocasionalmente se puede encontrar algún área de calcificación, normalmente afectando a ganglios de la cabeza, cuello y mesentéricos. Focos purulentos y encapsulados no suelen realmente presentarse. Sobre la lesión en hígado, normalmente pequeña, pueden encontrarse pequeños tubérculos amarillentos caseificados pero raramente calcificados. En el pulmón la lesión suele ser muy pequeña,, con pocos focos miliares (LUKE, 1958).

OVEJAS

Lesiones similares a las encontradas en ganado vacuno, produciéndose encapsulamiento y calcificación (LUKE, 1958).

CIERVO

M. bovis induce a la aparición de múltiples abscesos con contenido purulento, sin material caseoso. Las mayores lesiones quedan localizadas en ganglios mesentéricos, aunque también se puede ver afectado , en pocos casos el ganglio mandibular y retrofaríngeo. Ulceración en la mucosa cecal, nódulos en pulmón y tonsilitis purulenta (FEETWOOD y cols., 1988). R.C. ROBINSON y cols (1989) y se describen lesiones purulentas sin encapsulamiento fibroso y en las cuales la calcificación es rara.

M. avium no produce lesiones visibles (ROBINSON y cols., 1989).

VISON

M. bovis provoca esplenomegalia, ausencia de células de Langhans, presencia de elementos reticulares en los granulomas tuberculosos (HEIJLÍCEK y cols., 1973). C.O. THOEN y cols (1988) describen lesiones tuberculosas visibles en ganglios mediastínicos y cervicales, microscópicamente granulomas conteniendo células multinucleares y epitelioides, con un área central de necrosis y en algunos casos mineralización. La infección en esta especie es bien delimitada y solo en algún caso se observa una enfermedad pulmonar progresiva.

7.- DIAGNOSTICO

7.1.- CLINICO Y ANATOMOPATOLOGICO

Para el diagnóstico de la tuberculosis son útiles los síntomas clínicos, así como las lesiones anatomopatológicas e histopatológicas. Las lesiones morfológicas típicas de tuberculosis permiten por lo general orientar el diagnóstico. Sin embargo, las zonas con alteraciones pueden ser tan pequeñas que se escapan incluso a un reconocimiento detenido. También resulta extremadamente importante la inspección de los ganglios retrofaríngeos pues M. RIVAS y cols.(1985), observan un alto tanto por ciento de ganado

vacuno que presenta solamente como lesión tuberculosa la afección de dichos ganglios, observando tras el aislamiento un 70.73 p.100 de animales infectados por *M.bovis* y 26.83 p.100 por micobacterias atípicas.

En la tuberculosis caprina existe una tríada sintomatológica: tos, anemia y adelgazamiento progresivo (PERREAU y SAVEY, 1982). No obstante, el diagnóstico clínico es difícil de realizar ya que la tuberculosis pulmonar en esta especie es compatible con un buen estado general o por el contrario presenta signos localizados y generalizados similares a los de la tuberculosis bovina (respiración ruidosa, tos, alteración del estado general, mamitis tuberculosa con hipertrofia de la mama y ganglios retromamarios (THOREL, 1984). Asimismo, el diagnóstico basado en las lesiones macroscópicas puede inducir a error, A. SHARAN y cols., (1988) observan que de 98 caprinos con lesiones similares a tuberculosis solamente dos casos eran reales. Ha de tenerse presente que las lesiones hemorrágicas, piógenas o caseosas no constituyen lesión patognomónica de tuberculosis. Así queda constatado por T.L SOM y BHATTACHARYYA (1987) que aislaron de ganglios con estas lesiones gérmenes muy variados: *E.coli*, *C.ovis*, *Strep.pyogenes*, *St.aureus*, *M.bovis*, *M.tuberculosis*, *C.pyogenes*, *Salmonella sp*.

7.2.- LABORATORIAL

Toma de muestra: En las formas abiertas de tuberculosis se puede tomar exudado pulmonar por medio de hisopos traqueales o por técnicas cruentas (traqueotomía). En caso de tuberculosis mamaria, está indicada la toma de muestra de leche. Los análisis microbiológicos de otras secreciones y excreciones como jugo gástrico, o las obtenidas por punción, la orina o heces son más propias y aptas de clínica de campo. También se pueden tomar muestras de canales y productos cárnicos (DEDIE, 1973).

7.2.1.- Histopatológico

La inmunohistoquímica puede poner de manifiesto antígeno micobacterial, pudiendo ser una alternativa al método convencional de Ziehl Neelsen (RADHAKRISHNAN y cols., 1991).

La lesión típica de la tuberculosis caprina pone de manifiesto la existencia de granulomas tuberculosos compuestos por polimorfonucleares, eosinófilos, células epitelioides y de Langhans, además de lesiones de caseificación y calcificación envueltas por tejido conectivo (THOREL, 1984), aunque según T. SCHLIESSER (1973), las calcificaciones son raras en esta especie, predominando las formas exudativas. M.M. GUTIERREZ y cols (1993), comparan la técnica de tinción de Ziehl Neelsen con la técnica inmunohistoquímica de la avidina biotina peroxidasa, encontrando a esta última más sensible que la primera para detectar bacilos alcohol ácido resistentes.

7.2.2.- Microbiológico

7.2.2.1.- Bacterioscópico

Coloración de Ziehl Neelsen: Son necesarios más de 10.000 micobacterias/ml para que sea positivo (ORTEGA y MARCH, 1979; CASAL, 1990; CAMINERO, 1992). La especificidad de este método es bastante elevada, ya que sólo se verá disminuida por otros microorganismos que también sean ácido-alcohol resistentes, destacando el resto de las micobacterias, nocardias, hongos, aunque estos últimos no poseen forma bacilar (CAMINERO, 1992).

7.2.2.2.- Cultivos convencionales

Los distintos medios de cultivo, así como la valoración de cada uno de ellos han quedado referidos en el apartado 2.3 de revisión bibliográfica.

La utilización de este método diagnóstico sobre animales aparentemente libres de lesiones tuberculosas aumenta el número de casos detectados (KANTOR y cols., 1987).

Debido a que en el ganado caprino se han diagnosticado casos en los que se han aislado de un mismo animal a *M.bovis* y *M.paratuberculosis* (FUENTES, 1987; BERNABE y cols., 1991), O. FUENTES, 1987 aconseja utilizar para el aislamiento el medio de Löwenstein-Jensen y Herrold, ambos con y sin micobactina.

7.2.2.3.- Identificación

7.2.2.3.1.- Biológica

En este método diagnóstico se utilizan como animales de laboratorio al cobaya, conejo y pollo en los que *M.tuberculosis*, *M.bovis* y *M.avium subesp. avium* presentan distinta virulencia tal como se muestra en el siguiente esquema (FUENTES, 1977 y CASAL, 1990).

Especie de <i>Mycobacterium</i>	Animales		
	Cobaya	Conejo	Pollo
<i>M.tuberculosis</i>	+	+ -	0
<i>M.bovis</i>	+	+	0
<i>M.avium</i>	+ -	+	+

Símbolos: 0: Muy resistente
 + -: Ligeramente receptivo
 +: Claramente receptivo

La inoculación experimental a partir de lesiones tuberculosas caprinas producidas por *M.bovis* a conejos y cobayas les produce una tuberculosis generalizada (MILNE, 1955). No obstante L.W. LESSLIE y cols.,(1960) inoculan intradérmicamente material patológico procedentes de cabras infectadas por *M.avium* a cobayas, a las seis semanas postinoculación los sacrifican y no encuentran lesión alguna. Cultivan la muestra en medio de Stonebrink e inoculan este material intramuscularmente a cobayas, conejos y pollos. Transcurridas 4 semanas son sacrificados observándose en los conejos y pollos lesiones generalizadas (algunos mueren antes de las 4 semanas sin dar tiempo al sacrificio), en los cobayas observan septicemia de tipo tuberculoso.

O. FUENTES (1987), inocula a conejos y pollos por vía intravenosa la dosis de 0,001 ml de cultivo puro de *M.bovis* y a los cobayas la misma dosis pero vía intraperitoneal. A los 8-10 días de la inoculación empieza un decaimiento general y pérdida de peso.

A veces aparece disnea y fiebre, pero no constante. A partir de las ocho semanas postinoculación y según el estado de salud en que se encuentre, les efectúa una sangría. Se realiza la necropsia y de los órganos afectados se efectúa una bacteriología, siembra en agar sangre, Löwenstein Jensen y Herrold con y sin micobactina (FUENTES, 1987)

7.2.2.3.2.- Tipificación de micobacterias por reacciones químicas

La diferenciación de las distintas especies del género *Mycobacterium* efectuar mediante identificación bioquímica (TABLA VII)(FUENTES, 1987, CASAL y CLEMENTE, 1990).

Actualmente existen tres subespecies de *M. avium* en base a su patogenicidad y huésped atacado:

M. avium subesp. avium: productor de tuberculosis en aves

M. avium subesp. paratuberculosis: productor de la paratuberculosis en rumiantes y posiblemente de la enfermedad de Crohn en el hombre.

M. avium subesp. silvaticum: causante de tuberculosis en pájaros y paratuberculosis en mamíferos . Sus caracteres diferenciales quedan reflejados en la tabla siguiente (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

		<i>avium</i>	<i>paratuberculosis</i>	<i>silvaticum</i>
Tipo colonia		S	R	R
Crecimiento estimulado por	piruvato	+	+	-
	pH5.5	-	-	+
Requiere micobactina		-	+	-
Crece en medio con huevo		+	+	-
Crece con 5 %CINa		+	-	-
Fosfatasa alcalina		+	-	+
Sensibilidad a	Cicloserina (50µg/ml)	+	-	+
	Rifampicina (1µg/ml)	-	-	+

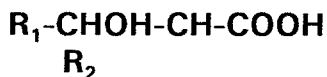
7.2.2.3.3.- Fagotipia

La técnica de tipificación de micobacterias por fagos fue descrita por Redmond y Ward en 1966, con las modificaciones introducidas por RADO y cols. (1975) y BATES y cols., (1976) y la clasificación descrita por GRANGE y cols, (1976), existiendo una frecuencia de fagos tipos de acuerdo con el país de origen y la cepa.

7.2.2.3.4.- Cromatografía de gases, cromatografía de capa fina (MARTIN y VALERO, 1986; VALERO y MARTIN, 1987).

Basado en la riqueza en lípidos de las micobacterias, los cuales se encuentran en la pared celular y membrana plasmática. Estos lípidos tienen estructuras muy diversas, y juegan un papel en la biología y propiedades biofísicas del desarrollo celular. Por

cromatografía en capa fina se detectan principalmente ácidos micólicos, cuya estructura general es:



Otra posibilidad de análisis de los ácidos micólicos consiste en el estudio de sus productos de pirolisis, por cromatografía de gases.

7.2.2.3.5.- Métodos de detección de micobacterias basados en el análisis de los ácidos nucleicos

Realizan el estudio molecular del genoma. Cuando se conoce la secuencia de una cadena de ADN, puede decirse la secuencia complementaria de la otra, pudiéndose utilizar esta propiedad para la detección e identificación de los ácidos nucleicos de algún microorganismo particular. Los dos métodos diagnósticos que se conocen en la actualidad son la reacción de hibridación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (TERPSTRA, 1990).

Identificación por PCR: Utiliza secuencias cortas de aproximadamente 20 nucleótidos, las cuales pueden asociarse a una cadena simple de ADN. Obteniendo al final del proceso una amplificación de alrededor de un millón de veces la secuencia de ADN estudiada. Después es fácil poder identificar la micobacteria causante de la infección (TERPSTRA, 1990). Hay que discernir si es capaz de diferenciar entre infección y enfermedad tuberculosa (CAMINERO, 1992). Esta técnica se muestra extremadamente sensible para la identificación de *M.bovis* y *M.tuberculosis complex* (COUSINS y cols., 1991).

Reacción de hibridación: Consiste en obtener cantidades cuantificables de una secuencia pura de ADN de una determinada micobacteria, que puede ser utilizada como sonda que detecte específicamente el ADN de este microorganismo. La sensibilidad de la técnica es inferior a la del frotis directo (TERPSTRA, 1990).

La secuencia IS1081, encontrada en *M.bovis* y *M.tuberculosis*, queda propuesta por COLLINS y STEPHENS (1991) para ser utilizada en el desarrollo de técnicas diagnósticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, al no haberse detectado esta

secuencia en otros actinomicetales.

T. BARRY y cols. (1993) combinan el PCR con una sonda de ADN y observan que es factible para detectar animales infectados por *M.bovis*. Toman como muestra la sangre de vacunos infectados, lo que significa que en la sangre se encuentran fragmentos resultantes de la degradación del ADN de la micobacteria. Esto contrasta con las técnicas microbiológicas clásicas, que requieren la presencia de organismos viables en la sangre para conocer el tipo de infección que sufre el animal en fase septicémica, lo cual ocurre solamente en estados muy avanzados de la enfermedad. Además la identificación con esta técnica queda finalizada en tan sólo 24 h

7.2.2.3.6.- Método ELISA

La técnica ELISA ha sido realizada por L.A. CORNER y cols (1988) para la identificación de *M.bovis*, utilizando anticuerpos monoclonales permite la identificación de la micobacteria en tan sólo 4 horas, comparado con los métodos convencionales de sensibilidad antibiótica que tardan tres semanas.

Los anticuerpos monoclonales SB1, SB2; SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9 y SB10 son específicos de *M.bovis*, y tan sólo presentan reacciones cruzadas con algunas cepas de *M.tuberculosis*, todos ellos reconocen al antígeno MPB70 (WOOD y cols., 1988), VMB31, detecta sólo *M.bovis*; VMB6, VMB93, VMB99, VMB119, detectan *M.bovis* y *M.tuberculosis*; el anticuerpo VMB73, resulta ser más inespecífico detectando *M.bovis*, *M.tuberculosis*, *M.kansasii*, *M.fortuitum*, *M.paratuberculosis*, *M.avium* serovar 1, *M.avium* serovar 2, *M.avium* serovar 4, *M.avium* serovar 8, *M.avium* serovar 10, *M.chelonae*, *M.phlei*, *M.scrofulaceum*, *M.smegmatis*, *N.asteroides* y *R.equi*. No obstante MVB6 no identifica las cepas AN-5 ni la de Pasteur de *M.bovis*. La técnica del dot-blotting utilizando anticuerpos monoclonales de *M.bovis* y un soporte sólido de nitrocelulosa permite la identificación de *M.bovis* en tan sólo 4 h comparado con las tres semanas de los de sensibilidad antibiótica (VEERMAN y cols., 1990). Los anticuerpos monoclonales F23-49 y F24-2 presentan una especificidad y una sensibilidad del 100 p.100 para la identificación de *M.tuberculosis complex*. Los anticuerpos monoclonales F85-2 y F85-10 tienen una especificidad del 100 p.100 y una sensibilidad del 70 p.100 para *M.avium complex*. El anticuerpo F126-22 es específico para

M.kansasii y el F141-3 es capaz de distinguir las micobacterias de otras bacterias (SCHÖNING y cols., 1990).

B.J. DUFFIELD (1990), utiliza un ELISA doble sandwich para detectar *M.bovis* utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos y en segundo lugar un anticuerpo monoclonal hecho en ratón, siendo capaz de detectar cultivos puros de *M.bovis*, a concentración de 10^5 UFC. Con este ELISA no se producen reacciones cruzadas con micobacterias contaminantes como *M.avium intracellulare-scrofulaceum*, *M.terrae*, *M.fortuitum*, *M.flavescens* u otras bacterias como *E.coli* o *Rhodococcus equi*.

7.2.3.- Medición de la respuesta inmune

7.2.3.1.- Celular

7.2.3.1.1.- Intradermorreacción tuberculínica

Es un método muy sensible, que puede dar negativa en pacientes (humanos) inmunodeprimidos, en formas diseminadas agudas de la enfermedad y en el período prealérgico (CAMINERO, 1992). La técnica puede resultar negativa en vacunos con infecciones recientes, en los que tras su sacrificio se observan lesiones típicas de tuberculosis (NEILL y cols., 1994).

Se llama tuberculina al extracto de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium avium*, que se emplea como antígeno en el diagnóstico intradérmico en los animales para identificar a los que padecen una infección de esta naturaleza. Cuando se inyecta a un animal sensibilizado se producirá una respuesta de hipersensibilidad tardía. Se produce una vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. La población de células del infiltrado es mayoritariamente mononuclear, en las reacciones muy graves puede haber necrosis en el lugar de la inyección. Se cree que los linfocitos T circulantes sensibles a los antígenos, encuentran al mismo y responden haciendo que las células cebadas vecinas desgranulen y liberen factores vasodilatadores como la serotonina. El aumento de la permeabilidad vascular permite que los linfocitos T emigren desde sangre hacia los tejidos, donde localizan a los antígenos. Posteriormente los linfocitos se dividen y liberan

linfocinas que atraen a linfocitos y macrófagos, estos últimos ingieren y destruyen al antígeno inyectado (TIZARD, 1987; CAMINERO, 1992).

Las tuberculinas empleadas para realizar esta técnica diagnóstica son objeto de estrictas regulaciones (DIRECTIVA DEL CONSEJO 64/432, 1964) internacionales que garantizan la calidad e intercambiabilidad del producto.

La normativa comunitaria europea, ha establecido una Unidad Comunitaria de Tuberculina (UCT), que equivale a 2,5 U.I. El único conservante admitido es el fenol, con una concentración máxima de 0,5 p.100 y en las preparaciones líquidas, el glicerol hasta el 10 p.100. Para su utilización en la CEE una tuberculina debe contener al menos 2000 UCT por dosis de 0,1 ml, lo que debe comprobarse por métodos químicos y biológicos .(HAAGSMA, 1986).

Este método intradérmico puede realizarse de distintas formas, no obstante las modalidades más usadas en la actualidad son la intradermorreacción simple y la comparativa. Estudios realizados por D.E. SUTHER y cols. (1974) en ganado vacuno, muestran, que el lugar de elección de la intradermorreacción tuberculínica es la zona cervical. La mejor lectura se realiza a las 72h, aunque no existe una gran variación con la realizada a las 48 h post-inoculación.

El uso de la intradermorreacción simple muestra en el ganado bovino una especificidad del 61.1 p.100 y un 80 p.100 de sensibilidad (STUART, 1988). Si bien J. FRANK y cols.(1989) hablan de una sensibilidad del 95 p.100, aunque se producen reacciones cruzadas con otras especies de micobacterias, lo que da unos bajos niveles de especificidad. La sensibilidad y la especificidad de la técnica no parecen estar bien definidos, pues otros autores obtienen datos muy distantes de los anteriores, D.E. SUTHER y cols. (1974) obtienen un gran número de falsos positivos, quedando demostrada la sensibilidad de la técnica en un 21,8 p.100, según estudios realizados utilizando un lote de ganado infectado y otro no infectado, lo que demuestra la dificultad del diagnóstico utilizando dicha técnica. M. RODRIGUEZ y cols. (1983) encuentran el hecho desconcertante de que repetidamente vacunos diagnosticados como positivos mediante la intradermorreacción no presentan lesiones macroscópicas en el matadero en un porcentaje que a veces se aproxima al 50 p.100 y S.D. NEILL y cols. (1992) tras inoculación experimental de *M.bovis* a vacunos observan que los animales dan

negativos a la intradermorreacción , siendo posible posteriormente el aislamiento de *M.bovis* del tracto nasal de estos animales saneados lo cual tiene una implicación en los programas de control y erradicación de la tuberculosis.

La sensibilidad de la misma varía dependiendo del tipo de tuberculina empleada. Así S.J. OLIVEIRA y cols. (1983) ensayan en vacuno una intradermorreacción utilizando PPD humana y comparan sus resultados con los obtenidos con PPD bovino AN5, concluyendo en la mayor especificidad de esta última. S. NAGAI y cols. 1991 observan que la potencia de MPB70 en la intradermorreacción realizada a cobayas previamente sensibilizados era 1/20 respecto a la obtenida con PPD. En 1983, K. MIURA y cols. estudian una intradermorreacción experimental con PPD bovina y MPB70, ensayada en conejillos de india sensibilizados unos con BCG y otros con micobacterias muertas por el calor. Observan que MPB70 desarrolla una reacción en piel en los conejillos sensibilizados con BCG pero no a los sensibilizados con células muertas , la reacción es máxima a las 4-8 semanas después de la inoculación con BCG, y decrece gradualmente, resultando negativa después de 20 semanas, cuando la reacción en piel con la PPD, continua siendo positiva. En otra experiencia inocularon los cobayas con distintas subcepas de BCG, realizaron intradermorreacciones con PPD y con el antígeno MPB70; todas excepto la subcepa None responden al PPD a la cuarta semana, a las seis semanas todas las subcepas responden al MPB70 excepto la Copenhagen, pero reaccionan débilmente, excepto la Moreau y la Tokio, frente a las que se obtiene una fuerte reacción. Estudios posteriores de filtrados de estas subcepas de BCG en gel de poliácridamida, muestran que sólo las subcepas Moreau y Tokio producen y segregan MPB70 *in vivo* y sensibilizan al hospedador a esta proteína. Los filtrados de Tokio y Moreau mostraron también bandas pertenecientes a MPB64 y MPB80, no obtenidas en el resto de las cepas. El MPB70 en la subcepa Tokio representa el 10 p.100 del total de las proteínas secretadas mientras está creciendo.

La ventaja del método simple es su facilidad de uso, su inconveniente es que no es posible distinguir entre las infecciones producidas por diferentes tipos de micobacterias y del grupo *Nocardia*, pudiendo dar lugar a falsos negativos en los animales que tienen una infección temprana, en aquellos que han tenido un parto cuatro o seis semanas anteriores a la realización de la técnica, en vacas viejas y en casos avanzados de tuberculosis (TIZARD, 1987).

El método comparativo emplea tanto tuberculina aviar como bovina, y se inyectan a un lado del cuello en lugares separados. En general, si donde se inyectó la aviar muestra una reacción más grande se considera que el animal está infectado por *M.avium subesp. avium* o *M.avium subesp. paratuberculosis*, por el contrario si la mayor reacción está donde se inyectó la bovina se piensa que la infección es debida a *M.tuberculosis* o *M.bovis* (TIZARD, 1987).

Esta modalidad ha sido ensayada en distintas especies, así: C.O. THOEN y cols. (1988) realizan un estudio de la intradermorreacción en visones infectados por *M.bovis*, utilizando la técnica comparativa a nivel cervical y en el pliegue caudal y, obtienen mejores resultados utilizando de forma conjunta estos dos puntos de inoculación. A.J. FLEETWOOD y cols, (1988), ensayan la intradermorreacción en ciervos, utilizando PPD bovina y PPD aviar, obteniendo buenos resultados con ambas.

En la especie humana la causa de falsos resultados negativos puede deberse a: idiosincrasia propia de la persona, al PPD utilizado (almacenamiento inadecuado,, desnaturalización química), la vía de administración (dosis insuficiente, administración retrasada, una vez extraída, con permanencia prolongada en la jeringuilla; inyección demasiado profunda, de manera que no resulte intradérmica; inyección demasiado superficial con formación de una vesícula de paredes delgadas y de fácil ruptura con la consiguiente pérdida del líquido inyectado; inyección próxima a un área inflamada y vascularizada, por la que puede difundir el PPD y no quedar localizado en el lugar en que se administró) (PINA, 1992; PINA y cols., 1989; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1981; LORDI y RETCHMAN, 1988). La respuesta a la técnica intradérmica disminuye en ganado que ha sido tuberculinizado repetidamente o con grandes dosis de tuberculina (HALL y THOEN, 1983 y 1986)

La interpretación de este método, hay que realizarlo según la normativa española vigente, considerando positivos los aumentos de grosor de la piel superiores a 4 mm, dudosos los que están entre 2-4 mm y negativos menor de 2 mm (ORDEN MINISTERIAL 647/86 (1986). L.M. O'REILLY (1986) opina que bastaría con una interpretación más severa de la tuberculinización simple, considerando positivos aún los casos dudosos , para aumentar la sensibilidad de la técnica. Un efecto similar se conseguiría doblando la potencia de la tuberculina oficial a 4.000 UCT. No obstante, A. GRASSER y GRASSER (1986) opinan que la utilización de una tuberculina más diluida, permite diferenciar con mayor facilidad los positivos

específicos e inespecíficos en rebaños teóricamente libres de tuberculosis.

La primeras referencias sobre el uso de la intradermorreacción en caprinos datan de 1921 (GOLDEN, 1921 cit. THOREL, 1984 y MURRAY y cols. 1921 cit. THOREL, 1984). En 1941 EHRENREICH Y BELLER y por otro lado LATSCHAR, todos cit. LUKE, (1958), muestran que las cabras son sensibles a la técnica intradérmica y consideran a los animales como positivos cuando se produce un aumento en el grosor de la piel igual a 4 mm o mayor. K. DEDIE (1973) recomienda el pliegue de la cola como lugar para realizar la inoculación, inyectando 5000 UI y establece la positividad del método diagnóstico en un aumento entre 1,5 y 3 mm, y puede afirmarse que entre un 10-20 p.100 de las cabras del corral están infectadas cuando conviven con vacunos tuberculosos. Posteriormente M.F. THOREL y GAUMON (1977) , practican la intradermorreacción con PPD bovina en distintos lugares: cara lateral del cuello y pliegue caudal, inoculando 0,2ml de PPD bovina, o sea 5000 UI y en otro grupo 2500 UI. La reacción se mide a las 72h y se consideran positivos aquellos animales en los que se produce un aumento en el grosor de la piel de 4 mm. Concluyen que la dosis ideal es la de 0,2ml, o sea , 5000 UI de PPD bovina ya que sus resultados son más fácilmente apreciables. El lugar que ofrece unos resultados más sensibles para efectuar la intradermorreacción es la cara lateral del cuello. Realizan también una oftalmo-reacción sin obtener buenos resultados y confirman que esta técnica se ajusta a los mismos límites que en el vacuno. M.F. THOREL (1980 y 1984) vuelve a aportar estudios sobre la intradermorreacción tuberculínica en ganado caprino inoculando PPD bovina y PPD aviar en dos lugares: cara lateral del cuello y pliegue caudal inyectando 0.2ml. de cada tuberculina, o sea, 5000 UI, datos conformes con los indicados por la CEE que señalan 25000 UI/0.1ml (5000 UI/0.2ml), llegando a la conclusión de que se mantiene en los mismos niveles que en el vacuno. La lectura ha de realizarse a las 48 h post-inoculación (SHAROV, 1986).

C.O. THOEN y cols.(1984), sugieren esta técnica como un buen método para el diagnóstico de la tuberculosis en ganado caprino. La técnica revela una alta sensibilidad para el caprino, pero una baja especificidad, observándose un gran número de animales positivos, en los cuales no se observan lesiones propias de tuberculosis pero si de otras enfermedades como: nefritis, fuertes parasitosis o severas infecciones del pie. Se recomiendan 60 días de intervalo entre intradermorreacciones y el uso del comparativo

en la región cervical con 0,1 ml (0.5 mg/ml) de PPD aviar y 0,1 ml. de 1 mg/ml. de PPD bovino, una en el lado derecho y la otra en el izquierdo. La lectura se realizará a la 72 h. Se considera reacción positiva desde una hinchazón visible y palpable hasta un incremento del grosor de la piel de 2 mm ó más, o simplemente la aparición de inflamación y edema (ALLEN y cols., 1987). Asimismo otros autores hacen hincapié en la baja especificidad de la misma, y así Y.S. LU y cols. (1992) de tres caprinos tuberculosos positivos, aíslan de uno de ellos *M.bovis*, y en los otros dos *C.pseudotuberculosis*. S.P. NAIN y cols. (1985) observan reactores paratuberculosos positivos a la intradermorreacción tuberculínica que complican el diagnóstico de la tuberculosis. Un resultado positivo revela que el animal ha estado en contacto con bacilos tuberculosos o que está infectado por ellos aunque la necropsia no demuestre la presencia de lesiones. Pero el resultado negativo es de menor valor diagnóstico, pues hay un período post infectivo entre 8 y 60 días, en el cual no se ha producido todavía el estado alérgico y otro período final o estado de anergia en el cual aunque los animales estén caquéticos no reaccionan (FUENTES, 1987). B. ACOSTA y cols. (1993) comparan los resultados obtenidos mediante esta técnica con los resultados de aislamiento en estos mismos animales obteniendo un 41,2 p.100 de aislamientos frente a un 58,8 p.100 de animales tuberculino positivos en los que no se obtuvo aislamiento de micobacterias.

Para G. PERRIN y cols.(1984) la intradermorreacción tuberculínica simple en ganado caprino utilizando PPD bovina, es una técnica bastante específica; y mediante la inoculación de 0,2ml de PPD bovina da buenos resultados. De 38 animales 29 son positivos a este método, y de estos, 27 presentan lesiones macroscópicas y los otros dos son confirmados por estudios histopatológicos. Todos ellos fueron confirmados por diagnóstico bacteriológico.

R.L. SANSON (1988) opina que existe la necesidad de estabilizar la sensibilidad y especificidad de la técnica en ganado caprino.

La intradermorreacción tuberculínica facilita el diagnóstico diferencial con la actinomicosis y la actinobacilosis; con las estrongilosis pulmonares, con las secuelas de bronconeumonías infecciosas y con el Maedi, pero no con la pseudotuberculosis o la paratuberculosis, entre otras. Para la diferenciación con esta última se debe de efectuar una doble tuberculinización con PPD bovina y con tuberculina aviar o mejor con la paratuberculina. Se compara la intensidad de reacción a cada tuberculina y se diagnostica una u

otra enfermedad teniendo presente que pueden estar presentes las dos bacterias en un mismo animal, tal como describen A. BERNABE y cols. (1991) y Y.S. LU y cols. (1992).

7.2.3.1.2.- Transformación linfoblástica

Esta técnica se fundamenta en la capacidad de multiplicación de los linfocitos de animales sensibilizados, cuando se cultivan en condiciones óptimas junto a antígenos específicos. El grado de estimulación linfocítica suele ser expresado como índice de estimulación, y es medido por la cantidad de timina triada que se incorpora durante la síntesis de ADN, y que se reflejará en un número determinado de contajes por minuto (c.p.m.) en un contador de centelleo. El resultado de dividir el c.p.m. de los linfocitos estimulados con antígeno específico por las c.p.m. de esos mismos linfocitos sin estimular, corresponderá con el índice de estimulación.

La inmunidad mediada por células al derivado proteico purificado (PPD) ha sido medida *in-vitro* mediante la técnica de proliferación linfoblástica usando linfocitos purificados y cultivos de sangre (OUTTERIDGE y LEPPER, 1973; JENSEN y cols., 1977; VILJANEN y ESKOLA, 1977; THOEN y cols., 1980)

J.F. GRIFFING y cols. (1991), comparan el método de transformación linfoblástica con los resultados de un ELISA con MPB70 en el diagnóstico de la tuberculosis, observando que el MPB70 más específico indicando infección por *M.bovis*.

Esta técnica diagnóstica resulta impracticable cuando el número de animales a diagnosticar es grande debido al largo período de incubación que requiere (ROTHEL y cols., 1990).

7.2.3.1.3.- γ -interferón bovino

Esta técnica mide la inmunidad celular mediada por células, introducida recientemente por investigadores australianos (WOOD y cols., 1989; ROTHEL y cols., 1990; WOOD y cols., 1991; WOOD y cols., 1992). Basada en la detección de γ -interferón producido en 24h. *in-vitro* en un cultivo de sangre heparinizada, usando como antígeno el derivado proteico purificado (PPD) de micobacterias.

Como resultado de la estimulación antigénica, los linfocitos T circulantes presentes en la muestra de sangre secretan γ -interferón que es medido mediante una técnica inmuno-enzimática (EIA).

J.S. ROTHEL y cols.,(1990), desarrollan un método de diagnóstico celular *in-vitro* para detectar tuberculosis bovina. Este ensayo detecta γ -interferón liberado en respuesta a un antígeno específico en un sistema de cultivo de sangre entera . Utiliza en la técnica inmunoenzimática (EIA) dos anticuerpos monoclonales a γ -interferón bovino. El EIA detecta menos que 25pg/ml de γ -interferón bovino recombinante y no detecta α o β -interferón bovino. Reconoce γ -interferón de vacuno, ovejas, cabras, y búfalos, pero no de ciervos, cerdo u hombre. Este EIA de γ -interferón bovino usado en conjunción con el sistema de cultivo de sangre entera resulta en un ensayo *in-vitro* simple, rápido y sensible para la respuesta inmune específica mediada por células en ganado infectado por *M.bovis*. P. WOOD y cols.(1991) obtienen para esta técnica diagnóstica una especificidad entre 92.2 p.100 y 98.1 p.100 dependiendo del punto de corte del control positivo y una sensibilidad significativamente más alta que la obtenida mediante el uso de la técnica intradérmica resultando ser para el γ -interferón de 76.8 p,100 a 93.6 p.100 comparada con los resultados obtenidos con el método intradérmico simple que fue de 65.6 p.100. La máxima sensibilidad se obtuvo al emplear ambas técnicas de forma conjunta en el diagnóstico de la tuberculosis bovina por *M.bovis*, resultando de esta práctica conjunta una sensibilidad del 95.2 p.100. P. WOOD y cols.(1992) comparan la técnica del γ -interferón bovino utilizando como antígeno el derivado proteico purificado (PPD) con los resultados obtenidos mediante el uso de la técnica ELISA con antígeno MPB70, obteniendo mejores resultados con PPD, que da una sensibilidad del 81.8 p.100 y una especificidad de 99.1 p.100, frente a los obtenidos con el antígeno MPB70 que son de 18.1 p.100 y 96.4 p.100, respectivamente.

Esta técnica es capaz de detectar bovinos anérgicos a la intradermorreacción, que se encuentran infectados recientemente (NEILL y cols., 1994), obteniéndose con ella mejores resultados que con la intradermorreacción (COUSINS y cols., 1993).

Resultados similares son obtenidos en ganado caprino por D.V. COUSINS y cols.(1993) que la técnica de la intradermorreacción PPD bovina (1 mg/ml.), con inoculación cervical a 19 cabras y tan sólo obtienen reacción positiva en una de ellas. Las mismas cabras son diagnosticadas mediante γ interferón y trece de ellas

resultan positivas entre la que se encontraba la positiva a la intradermorreacción. Tras sacrificio e inspección de los 19 animales no se observa ninguna lesión microscópica. *M. bovis* fue aislado tan sólo de la que dio positiva a la intradermorreacción y γ -interferón. En otra experiencia trabajan con 55 caprinos positivos a la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina. Posteriormente realizan con ellos la técnica del γ -interferón con PPD aviar para el diagnóstico de tuberculosis, 37 animales dan positivos a la PPD aviar en el γ -interferón. No se pudo aislar ninguna micobacteria.

En el ganado caprino J.S. ROTHEL y cols. (1990), observan que es una técnica rápida y sensible en la detección de animales infectados por *M. bovis*.

7.2.3.2.- Humoral

Esquemáticamente, la gran mayoría de los estudios serológicos han utilizado una técnica para tratar de detectar la cantidad de anticuerpos (el más rentable en la tuberculosis es la IgG), que se ligan a un antígeno micobacteriano que previamente ha sido aislado. Sin embargo, otras veces se han utilizado anticuerpos para tratar de detectar antígenos micobacterianos, siendo esta última la que más se emplea en humana sobre muestras biológicas diferentes al suero (CAMINERO, 1992).

7.2.3.2.1- Método E.L.I.S.A.

La búsqueda de métodos serológicos sensibles para la detección de antígenos y anticuerpos, que no necesitara marcadores radioactivos dio lugar a principio de los años 72 al desarrollo de una serie de métodos basados en la conjugación química de una enzima con un antígeno o anticuerpo. Los complejos antígeno-anticuerpo formados sobre una base sólida tras el lavado necesario para eliminar los reactivos sobrantes son puestos en evidencia mediante la adición del sustrato de la enzima conjugada, desencadenante de una reacción coloreada, observable a simple vista, o sensible de medir por densimetría óptica. Dentro de este marco teórico se han desarrollado distintos métodos, todos ellos caracterizados de forma general por su versatilidad (al poder orientar la técnica a la detección de antígenos o anticuerpos), sencillez de

realización, repetibilidad, así como el uso de reactivos relativamente económicos y estables. Todas estas circunstancias lo convierten en el sistema ideal para el diagnóstico, estudios epidemiológicos, detección de hormonas, drogas, etc (CATTY y RAYKUNDALIA, 1988).

La técnica fue descrita por primera vez por E. ENGVALL y PERLMANN (1972) y aplicada por primera vez en el diagnóstico de la tuberculosis en 1976 por E. NASSAU y cols.

La elección del antígeno a la hora de detectar mediante la técnica ELISA animales tuberculosos resulta ser de gran importancia (HANNA y cols., 1989).

Para C.J. THORNS y MORRIS (1983) la especificidad de los anticuerpos de los animales infectados por *M.bovis* es baja o no detectables por este método. No obstante son muchos los estudios que ponen de manifiesto el hecho contrario y que realmente todo depende de la elección del antígeno, tal como reseña J. HANNA y cols. (1989). Así L.A. AUER en 1987 mostró que el antígeno *M.bovis* crudo sonicado carece de la especificidad y sensibilidad requerida para la identificación de animales infectados, los valores de la técnica dependen de su uso conjunto con la intradermoreacción tuberculínica, siendo capaz de detectar una proporción de animales anérgicos infectados por *M.bovis*, la sensibilidad fue del 88.7 p.100 y un 63 p.100 de especificidad. Para ganado tuberculino positivo o nunca tuberculizado la especificidad fue de 52.6 p.100. Más tarde L.A AUER y SCHELEHANF (1988), observan la necesidad de una buena elección del control negativo para la evaluación de la técnica ELISA en el diagnóstico de la tuberculosis cuando se utiliza este antígeno, ya que con él se obtiene un alto tanto por p.100 de falsos positivos (39.5 p.100), ganado del cual se aíslan otras micobacterias, y un 56.4 p.100 con otras patologías.

Posteriormente L.A. DOWLING y cols. (1991), utilizan como antígeno *M.bovis* sonicado, *M.avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS), para detectar infección por *M.bovis*. Observan que se producen falsos positivos y reacciones cruzadas con los distintos antígenos. Indican que la intradermoreacción quizás aumente la respuesta en el método ELISA cuando el animal está infectado por *M.bovis*.

Tampoco son buenos los resultados obtenidos mediante el

método ELISA indirecto utilizando como antígeno un filtrado crudo de *M.bovis*, este antígeno muestra una baja especificidad y sensibilidad, pero es capaz de detectar ganado anérgico, esto justificaría el uso del mismo en la técnica ELISA como método complementario a la intradermorreacción u otros métodos diagnósticos de laboratorio que detectan inmunidad mediada por células. Aunque resulta ser bastante inespecífico ya que detecta micobacterias distintas a *M.bovis*, además de *Rhodococcus equi* y *Nocardia asteroides* (PLACKETT y cols., 1989). También se han realizado estudios utilizando como antígeno PPD (THOEN y cols., 1983) que produce una gran reacción en ganado positivo a la técnica intradérmica cuando se usa carbodiimida para unir el antígeno a la placa. Reaccionan asimismo algunos animales que fallaron a la intradermorreacción. Se pone de manifiesto la baja especificidad del antígeno ya que sueros de animales infectados con otras micobacterias reaccionaban en el ELISA. V. RITACCO y cols. (1990) utiliza PPD autoclavada obteniendo unos valores más consistentes y discriminativos que los obtenidos con PPD no tratada por calor sino con fenol. La sensibilidad y la especificidad llegan al 90 p.100. P. PLACKETT y cols.(1989) comparan las ventajas de usar este PPD autoclavado con el uso de un antígeno filtrado no calentado el cual no ha sido expuesto a fenol u otra proteína desnaturalizada no encontrando ninguna ventaja.

M.R. HALL y cols. (1986) desarrollan un ELISA para detectar infección por *M.bovis*, usando como antígeno un extracto de componentes de la pared celular de *M.bovis* virulento tratado con deoxicolato sódico. Este antígeno da valores más elevados detectando ganado infectado antes y después de 10 meses de haber sido expuestos a *M.bovis* que para la PPD bovina. Este antígeno detecta principalmente animales infectados en los cuatro primeros meses post-infección, dando mejores resultados en estos animales que el PPD como antígeno (THOEN y cols., 1988).

El antígeno A60 obtenido por C. COCITO y VANLINDEN (1986), es un antígeno de *M.bovis* BCG, poco específico, presentando reacciones cruzadas en otras micobacteriosis. Su especificidad oscila en un 95-98 p. 100 (CAMINERO, 1990). Este muestra ser efectivo también en la detección de anticuerpos en pacientes bajo tratamiento cuyo cultivo es negativo, detectando niveles de anticuerpos solamente en un 45 p.100 de estos individuos (FADDA y cols., 1992). J.J. MCFADDEN y HOUDAYER (1988), utilizan este antígeno preparado a partir de distintas micobacterias (*M.bovis*, *M.paratuberculosis*, *M.avium*) con sueros de enfermos de la

enfermedad de Crohn y encuentran diferencias en los niveles de reacción con este antígeno. No se observan reacciones con este antígeno salvo algún caso en el que se piensa en la posible exposición previa a *M.tuberculosis* u otras micobacterias del medio ambiente.

Otro antígeno con el que se ha conseguido aumentar la sensibilidad y la especificidad de la técnica es el PID (fosfatidil inositol dimanósido) (TEPLIZKI y cols., 1987) de *M.bovis* para el diagnóstico de la tuberculosis humana presentando una especificidad del 80 p.100 y una sensibilidad de 82 p.100, mejores resultados que los obtenidos con PPD, aunque las diferencias no son significativas. C. ESPITIA y cols. (1989) utilizan el antígeno de 38kDa de *M.tuberculosis* el cual muestra una especificidad del 96 p.100 y una sensibilidad del 68 p.100, observándose un aumento de la especificidad en detrimento de la sensibilidad. También se ha utilizado la BCG como antígeno mostrando una sensibilidad del 100 p.100 y una especificidad del 80 p.100 (GARCIA-CARREÑO y cols., 1986).

El antígeno 5, obtenido por primera vez por T.M. DANIEL y ANDERSON (1978), se extrae tan sólo en *M.tuberculosis* y *M.bovis* (BENJAMIN y DANIEL, 1982) y se ha utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis humana, E.A. BALESTRINO y cols. (1988) obtienen una sensibilidad (81.4 p.100) y una especificidad (93.4 p.100) superior al PPD (82.6 p.100 y 54.9 p.100 respectivamente). No obstante S.L. CHAN y cols. (1990) obtienen unos porcentajes considerables de falsos positivos y falsos negativos. Este ELISA muestra ser efectivo también en la detección de anticuerpos en pacientes bajo tratamiento cuyo cultivo es negativo, detectando una disminución de la tasa de anticuerpos, mostrando una sensibilidad del 60 p.100 y una especificidad del 100 p.100 en individuos con meningitis y cultivo negativo (RADHAKRISHMAN y MATHAI, 1991).

N. CASABONA y cols. (1989), utilizan el antígeno PGL-TB1 (antígeno fenol-glicolípido) en el diagnóstico de la tuberculosis por *M.tuberculosis* en humanos, presentando una sensibilidad del 94.7 p.100 y una especificidad del 96.8 p.100, contrastado con PPD con el que se obtiene una sensibilidad del 50 p.100 y una especificidad del 93.5 p.100 para IgG y una sensibilidad de 71.1 p.100 y una especificidad de 59.7 p.100 para IgM.

El antígeno fosfatídico utilizado por J. HANNA y cols. (1989) es capaz de detectar anticuerpos a los 14 días post inoculación

experimental. Detectando animales en etapas tempranas de la enfermedad, que escapan al diagnóstico cuando utilizamos PPD. De ahí la importancia que tiene la elección del antígeno a la hora de detectar anticuerpos en animales tuberculosos.

También en humana se han obtenido buenos resultados con los antígenos glicolípidos (SAG A1, SAG B1, SAG C), aislados de *M. bovis* por Z. REGGIARDO y MIDDLEBROOK (1935)

No obstante, es el método ELISA indirecto con antígeno MPB70, el que mejores resultados ha mostrado en los últimos años en el diagnóstico de la tuberculosis animal por *M. bovis*. Es uno de los componentes más inmunorreactivos de *M. bovis*, reconociendo la mayoría de los animales infectados por *M. bovis*. Su especificidad es superior a la detectada utilizando como antígeno un filtrado crudo de *M. bovis* observándose un menor porcentaje de falsos positivos. Muestra una fuerte respuesta celular, tanto *in vivo* como *in vitro* (FIFIS y cols., 1989). Este antígeno MPB70 ha sido ensayado mediante ELISA, Dot blot, western blotting, observándose solamente reacciones cruzadas con *M. tuberculosis* (WOOD y cols., 1988, 1989). Es el principal antígeno de las cepas vacunales de BCG y *M. bovis* virulentas, por lo cual, al ser utilizado como antígeno de diagnóstico no diferencia entre cepas vacunales y cepas virulentas (RADFORD y cols., 1988). Ellos utilizan clones de fragmentos contenidos en el antígeno MPB70 de la cepa virulenta de *M. bovis* AN5. Los clones estudiados son: pB2a, pB3c, C4a, XB2a y XC2a. Estos son probados con anticuerpos específicos a MPB70 y anticuerpos monoclonales a *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Sólo el anticuerpo anti MPB70 y el anticuerpo monoclonal SB10 reconocen a los cinco clones. El clon C4a es reconocido por todos los anticuerpos, el pB3c es reconocido por casi todos excepto el SB9. Esto es indicativo de que los antígenos recombinantes reconocidos por los anticuerpos monoclonales son codificados por clones derivados de la separación, representando diferentes secciones del MPB70. Este clon tiene tres lugares específicos en *M. bovis*. Estos epítomos son reconocidos por anticuerpos presentes en algunos animales infectados por *M. bovis* pero no todos los infectados son detectados porque la respuesta humoral a la infección micobacteriana es notoriamente incierta, y altos niveles de anticuerpos son raros en etapas tempranas de la enfermedad. MPB70 estimula la inmunidad mediada por células tanto *in-vivo* como *in-vitro*, y puede predecirse que uno u otro MPB70 recombinante o fragmentos peptídicos sintetizados de MPB70 podrían funcionar como antígenos en ensayos de respuesta inmune

específica mediada por células a la infección tuberculosa bovina, posiblemente en conjunción con otros antígenos.

El antígeno MPB70 utilizando la técnica ELISA, no presenta reacciones cruzadas con *M.avium*, *M.paratuberculosis* ni con *Corynebacterium pseudotuberculosis*, observándose que la formación de anticuerpos a MPB70 es altamente específica de la infección por *M.bovis*, lo que puede significar un aumento de la sensibilidad de los procedimientos de diagnóstico en la infección natural por *M.bovis* (HARBOE y cols., 1990). Recientemente ha sido estudiado en el diagnóstico de la tuberculosis en orix (*Oryx leucoryx*) mostrando falsos negativos a la técnica pero nunca falsos positivos (WOOD y cols., 1992; FLAMAND y cols., 1994 y GOORGER y cols. (1994).

V. RITACCO y cols. (1990) evalúan la utilización de la técnica de ELISA indirecto en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, y observan que aunque con una adecuada especificidad (94.1 p.100) adolece de sensibilidad (73,6 p.100).

7.2.3.2.3.- Inmunofluorescencia

La microscopía de fluorescencia (CASAL, 1990, ORTEGA y MARCH, 1979) presenta la ventaja, frente al Ziehl-Neelsen, de su mayor rapidez en la lectura por lo que se pueden procesar muchas más muestras. La sensibilidad y especificidad de ambas técnicas son las mismas, aunque algunos trabajos le han concedido una mejor sensibilidad a la primera (STRUMPF y cols., 1979).

El método de la gota gruesa fluorescente (CASAL y CLEMENTE, 1989 ; CASAL, 1990), tiene mayor rapidez de lectura que el anterior, debido a la mayor concentración de la muestra. Es mucho más sensible que el Ziehl-Neelsen y también ligeramente más específica (CASAL y CLEMENTE, 1990).

La inmunofluorescencia indirecta detectando anticuerpos (IFA) usando como antígeno *M.bovis* y anti- IgG y anti-IgM de bovino conjugadas (LEPPER y cols., 1975) detecta un 77 p.100 de ganado con lesiones visibles de tuberculosis, de los cuales mediante intradermorreacción tan sólo el 83 p.100 de ellos salían positivos. La IFA detectó 25 de 31 animales con lesiones que fallaron a la técnica intradérmica. El método diagnóstico intradérmico da un total

de 6.2 p.100 de falsos positivos, la IFA da un total de falsos positivos de 21.2 p.100. La mayoría de los anticuerpos que se detectan mediante esta técnica son IgM. Al realizar la técnica con animales infectados por *M.bovis* de forma experimental, y utilizando como antígeno *M.avium* se producen reacciones cruzadas en casi todas las muestras (LEPPER y cols., 1977)

7.2.3.2.3.- Otras

Aglutinación: Desarrollado por ARLOING (1898). Hoy en desuso.

Fijación del complemento Realizada por primera vez por BROWN y PETROF (1918).

La fijación del completo y la hemaglutinación indirecta con suero sanguíneo, según Middlebrook y Dubos, quedan por debajo de las posibilidades de la técnica tuberculínica. Sin embargo, una hemaglutinación con suero lácteo puede revelar casi un 90 p.100 de las vacas con tuberculosis mamaria en establos infectados, aunque ciertamente, ha de contarse con un 15 p.100 de falsos positivos en los análisis de mastitis con otra etiología (DEDIE, 1973). Los resultados obtenidos con esta técnica en ganado caprino comparados con los obtenidos por técnica alérgica con confirmación microbiológica e histopatológica no se corresponden (THOREL, 1984), por lo que no se considera un buen método diagnóstico. En la especie humana CHAN y cols. (1990), ensayan la técnica con tres antígenos glicolípidos (A1, B1 y C1), obteniendo con todos ellos un porcentaje considerable de falsos positivos y falsos negativos.

Una nueva técnica diagnóstica para la tuberculosis ha sido realizada en ciervos, es un método diagnóstico en sangre que usa una combinación de parámetros inmunológicos e inflamatorios. Este se utiliza en ciervos falsos negativos obtenidos por la intradermoreacción, y ofrece una sensibilidad del 95 p.100 y una especificidad del 92 p.100, pudiendo detectar ciervos infectados por *M.bovis* y *M.avium* en fases más tempranas de la enfermedad que la intradermoreacción (FRANK y cols, 1989).

7.3.- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA TUBERCULOSIS

CAPRINA POR *M.bovis*

Según O. FUENTES (1987) hay que diferenciar:

* en casos de tuberculosis pulmonar con: actinobacilosis actinomicosis, estróngilos respiratorios, bronconeumonía enzoótica, Maedi.

* en casos de tuberculosis ganglionar con: linfadenitis caseosa y leucosis.

* en las formas digestivas con: paratuberculosis y estrongilosis gastrointestinal.

Teniendo en cuenta que la presencia de lesiones purulentas no constituyen signo patognomónico de tuberculosis (PERRIN y cols., 1984; FUENTES, 1987), se hace necesario el diagnóstico laboratorial (PERREAU y SAVEY, 1982).

8.- LUCHA

8.1.- TRATAMIENTO

Mediante ensayo de laboratorio (*in-vitro*), se ha observado que *M.bovis* es sensible a la isoniazida, etambutol, estreptomycin, rifampicina y ácido p-aminosalicílico. No obstante existen diferencias de sensibilidad en cuanto a la cepa, sabiéndose que la cepa de *M.bovis* ATCC35747 es resistente a la isoniazida, mientras que la ATCC35735 es sensible al mismo fármaco (ROUSEAU y DUPTUIS, 1990).

La isoniazida pura cristalizada ha sido utilizada en el tratamiento de ganado vacuno tuberculoso en dosis de 25 mg/kg/día durante 60 días. Clínicamente los animales quedan recuperados desde el segundo mes de tratamiento y salen negativos a la intradermorreacción tuberculínica a los 2-4 meses después del mismo. El porcentaje de curación queda cifrado en 96.4 p.100 (LANGENEGGER y cols., 1991).

Las micobacterias tuberculosas son resistentes a la penicilina pero lábiles a la estreptomycin (ROSENBERG, 1983 y HERNANDEZ

y DUBON, 1992) y rifampicina (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

8.2.- PROFILAXIS

La quimioprofilaxis y la inmunoprofilaxis resultan excesivamente caras en el tratamiento de la tuberculosis bovina, y podría enmascarar infecciones iniciales (KLEEBERG, 1988). Además resulta una práctica prohibida, según normativa comunitaria.

8.2.1.- Inmunitaria

Han sido numerosos los intentos de controlar la tuberculosis mediante vacunación. Koch y Behring realizaron vacunas preparadas con bacilo humano la cual causaba en ganado una enfermedad benigna y limitada.

A. CALMETTE y GUERIN (1908) obtuvieron un mutante atenuado de *M. bovis* tras 237 subcultivos en un medio con patata, glicerina y bilis. Es el bacilo de Calmette Guerin (BCG), que se utiliza como agente inmunizante contra la tuberculosis humana. Se administra por vía intradérmica y su grado de protección se señala en cifras muy dispares (15-80 p.100). Sólo se administra actualmente a personas con alto riesgo de infección (HERNANDEZ y DUBON, 1992).

En personas con depresión de la inmunidad celular se puede producir una infección micobacterial diseminada después de la inmunización con BCG (COPPE, 1992).

La BCG también se ha utilizado en otras afecciones en busca de un aumento de la respuesta celular, tal es el caso del asma bronquial en la que la eficacia del tratamiento depende del tipo de asma (LIND, 1991), y también se han realizado ensayos en la lucha contra la artritis reumatoide juvenil (SIUD, 1991).

S.A. GRIFFITH (1913) encuentra bacilos humanos viables en la leche de ganado vacunado. Más tarde fue realizada con bacilo tuberculoso y BCG (FRANCIS, 1947), siendo parcialmente efectiva, pero tenía el gran problema de inducir reacción a la tuberculina. La vacunación no se realizaba pues en países donde existían programas de erradicación basados en el sacrificio de animales positivos

a la técnica. También se han realizado vacunaciones a tejonos utilizando como cepa vacunal la BCG, originalmente introducida como una vacuna oral. El gran peligro de tales programas de vacunación es que siendo la BCG una cepa atenuada de origen bovino podría diseminarse al ganado y producir animales positivos a la tuberculina, ya que este método no distingue la infección por cepas virulentas de las avirulentas. En humana se ha utilizado también la vacunación con BCG pero estudios realizados con esta cepa hacen temer que pueda revertir a una cepa fuertemente virulenta (GRANGE y COLLINS, 1987).

8.2.2.- Sanitaria

Entre las medidas higiénico-sanitarias ha de evitarse el hacinamiento (NEILL y cols., 1989) y corregir las raciones deficientes (SANCHEZ, 1971).

Respecto a la cuarentena resulta obvio que en áreas libres de tuberculosis la introducción de nuevos animales comporta un grave peligro (BLOOD y RADOSTITS, 1989; MATTHIAS, 1981; WEBER y cols., 1988). Durante esta, todos los animales nuevos deben de ser chequeados mediante tuberculinización y situarlos en instalaciones separados de los animales ya existentes en la explotación. El personal atenderá a los animales en cuarentena al acabar la jornada con el resto (DUCAN, 1990).

Las personas que reaccionaran positivas a la tuberculina deben ser asignadas en la explotación a un trabajo sin contacto con los animales (SCHWABE, 1984; THOEN y cols., 1984).

El método sanitario elegido en la profilaxis de la tuberculosis bovina se resume en (JOURBERT, 1973):

- medidas defensivas que aspiran a la protección del establo sano.
- medidas ofensivas que se refieren al saneamiento del establo infectado.

Las medidas frente a esta importante zoonosis implica no sólo la de la tuberculosis bovina, sino también la de todas las especies animales, en la totalidad de sus formas.

8.3.- ERRADICACION

La cabra es un importante reservorio y difusor de *M. bovis*. La erradicación de la tuberculosis está exclusivamente enfocada al ganado vacuno, sin tener en cuenta otras especies que igualmente intervienen en la diseminación de la enfermedad (GOMEZ y cols., 1992). En las campañas de saneamiento habría que incluir a la especie caprina ya que sería absurdo mantener un ganado como este que pudiera reinfestar a las poblaciones de bovino ya saneadas (RODRIGUEZ y cols., 1989), máxime si tenemos en cuenta el peligro que corre el consumidor al ingerir leche cruda de caprino o quesos frescos (DAVENAS y DABRIGEON, 1955).

El uso de la intradermorreacción tuberculínica comparativa junto con el sacrificio de los animales reactivos, aceleraría el proceso de erradicación (BENETT 1989). Siendo este el mejor procedimiento de lucha (OVDIENKO y cols., 1989).

Hay que tener en cuenta que existen bovinos infectados por *M. tuberculosis* que dan positivos a la intradermorreacción y después en el matadero no presentan lesiones (BENET, 1990).

Después de la eliminación de la tuberculosis bovina por *M. bovis* mediante medidas de control adecuadas, en muchas naciones se ha comprobado en grado creciente el reemplazo de *M. bovis* por *M. avium* (MEISSNER, 1973).

La temprana identificación de nuevos focos de tuberculosis es importante para llevar a cabo los programas de erradicación de la tuberculosis (THOEN y cols., 1979).

S.D. NEILL y cols. (1992) tras la inoculación experimental de *M. bovis* a vacunos observan que los animales dan negativos a la intradermorreacción siendo posible posteriormente el aislamiento de *M. bovis* del tracto nasal de estos animales aparentemente saneados. Esto tiene una implicación en los programas de control y erradicación de la tuberculosis.

En áreas donde el reservorio de tuberculosis en vacunos es el tejón, hay que actuar eliminándolos de la misma (HEWSON y SIMPSON, 1987). O vacunación de los mismos con BCG, con los problemas que esto acarrea (COLLINS, 1987). En Inglaterra el número de bovino nuevamente infectados por tuberculosis aumentó

en un 100 p. 100 entre 1992-1993, debido a la existencia de tejones tuberculosos, por lo que hay que extremar el control de los tejones tuberculosos (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1994).

CAMPAÑAS DE CONTROL Y ERRADICACION

El control de la tuberculosis se basa en tres puntos: identificar y eliminar los animales infectados, prevenir la extensión de la infección y evitar la reintroducción de la enfermedad (BLOOD y RADOSTITS, 1989).

Existen dos modelos de realización de estas campañas en función de la capacidad económica del país (THOEN, 1988). Estos son diagnóstico y segregación por una parte, y diagnóstico y sacrificio por otra.

El método más recomendable siempre que se pueda practicar es realizar la técnica de la intradermorreacción tuberculínica y posterior sacrificio, y el *stamping out*. Obviamente es el que se practica en los países desarrollados, que pueden hacer frente al costo económico que esto supone, en especial por las indemnizaciones por sacrificio (THOEN, 1988; TIMONEY y cols., 1988).

A partir de estudios epidemiológicos previos las campañas deben iniciarse primero en las zonas de baja prevalencia, extendiéndose posteriormente a zonas de alta incidencia (BLOOD y RADOSTITS, 1989).

G.M. ALLEN y cols. (1987), opinan que a la hora de establecer programas de erradicación y control de la tuberculosis caprina se hace necesario:

- 1.- Establecer si las cabras pueden transmitir la enfermedad de una a otras.
- 2.- Establecer la sensibilidad y la especificidad de la intradermorreacción tuberculínica simple y comparada en esta especie.

Existe una laguna legislativa, al no existir medidas reglamentarias para el diagnóstico de la tuberculosis caprina, lo que puede tener consecuencias para la salud pública (ANONIMO, 1985).

En nuestro país la lucha y control de la tuberculosis se rige

por nuestra legislación vigente adecuada a los criterios comunitarios.

MATERIAL Y METODOS

1.- OBJETIVOS

El presente trabajo ha sido desarrollado para cumplir tres objetivos:

- OBJETIVO 1º.- ESTABLECER EL GRADO DE EFICACIA DE LOS ANTIGENOS MPB70 Y A60 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA.

Para ello hemos verificado primero la pureza del antígeno MPB70 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente realizamos la estandarización de la técnica ELISA indirecto para cada antígeno. Hemos evaluado la utilidad de ambos antígenos utilizando sueros de distintos lotes de animales infectados de forma natural con tres especies de actinomicetales:

- Infectados con *Mycobacterium bovis*.
- Infectados con *M. avium subsp. paratuberculosis*.
- Infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*

- OBJETIVO 2º.- DEMOSTRAR SI TUBERCULINIZACIONES REITERADAS DETERMINAN LA APARICION DE FALSOS DIAGNOSTICOS POSITIVOS.

Para ello hemos utilizado la intradermorreacción tuberculínica cervical comparativa, con PPD bovina y PPD aviar, dejando transcurrir distintos intervalos de tiempo entre las sucesivas inoculaciones. Comprobada esta fase hemos investigado cómo influye esta misma técnica aplicada repetidamente en animales infectados de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A la par se han tomado muestras de sangre de todos los animales de ambas experiencias, cuyo suero lo hemos analizado mediante el método ELISA indirecto con los antígenos A60 y MPB70, en las distintas etapas de las misma.

- OBJETIVO 3º.- ESTABLECER LA PREVALENCIA DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA EN LAS ISLAS DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE, MEDIDA MEDIANTE LA TECNICA ELISA CON ANTÍGENO MPB70.

2.- ANIMALES

2.1.- PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 1º.

Han sido utilizados tres grupos de animales:

- GRUPO 1.- 32 cabras que resultaron positivos a la intradermoreacción con PPD bovina. Procedentes de las campañas de saneamiento ganadero realizadas por la Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación en la isla de Gran Canaria (Municipio de Las Palmas). La edad de los animales osciló entre uno y cinco años. Todos ellos pertenecían a la Agrupación Caprina Canaria de un mismo rebaño, en régimen intensivo y emplazado en la barriada de Chile, en el vértice noreste de la isla y con un clima desértico tropical fresco. Antes de la eutanasia de los mismos se realizó una toma de sangre de los 32 animales (Tabla II).

En el examen anatomopatológico de dos de estos animales se encontraron lesiones en ambos localizadas en pulmón y ganglios bronquiales, de naturaleza caseosas sin áreas de calcificación, y lesiones parasitarias en esófago. Se tomaron muestras de las mismas en frascos estériles, que fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de su procesado microbiológico. No se pudieron inspeccionar ni tomar muestras del resto de los animales debido a que fueron sacrificados sin previo aviso. Todo el grupo resultó negativo a paratuberculosis mediante la técnica diagnóstica de la intradermoreacción con PPD aviar.

- GRUPO 2.- 15 muestras de suero de cabras infectadas de forma natural por *M.avium subsp. paratuberculosis* y diagnosticadas exentas de infección por *M.bovis* mediante la técnica intradérmica con PPD bovina. La infección por *M. avium subsp. paratuberculosis* fue confirmada mediante varios métodos de diagnóstico a los que se resultaron positivas: tuberculina con PPD aviar, inmunodifusión en el gel de agar con antígeno PPA₃ e inmunocitoquímica avidina-biotina sobre cortes histológicos con antisuero de *M.avium subsp. paratuberculosis* positivo. Uno de estos sueros provenía de un animal con infección comprobada microbiológicamente. Estos sueros fueron remitidos desde el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Murcia. Los animales eran de raza Murciano-Granadina (Tabla II).

-GRUPO 3.- 5 cabras seleccionadas por mostrar lesiones de linfadenitis caseosa por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ganglios linfáticos preescapulares o retromamarios (Tabla II). Resultado negativos al diagnóstico de tuberculosis y paratuberculosis mediante la técnica de la intradermorreacción comparativa con PPD bovina y PPD aviar. Procedentes del "Valle de Agaete" (Gran Canaria), entre dos y cinco años de edad, saneado de brucelosis y tuberculosis, desparasitado, con un sistema de explotación semi-intensivo. No existen antecedentes de tuberculosis ni por datos de campaña ni siquiera por la existencia de lesiones que hicieran sospechar de ella. Al finalizar la experiencia se confirmó microbiológicamente en estos animales la existencia de lesiones de linfadenitis caseosa por *C.pseudotuberculosis*.

2.2.- PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 2º.

- GRUPO 4.- Hemos trabajado con 21 cabras saneadas frente a tuberculosis y brucelosis (Tabla II). A partir de este grupo inicial de 21 cabras cuya edad quedó comprendida entre los tres y cinco años, formamos 7 lotes de tres animales y sobre ellos hemos aplicado sucesivas tuberculinizaciones con PPD bovina y PPD aviar, utilizando la intradermorreacción comparativa cervical de la siguiente forma:

- LOTE 1.-Se realizó a cada animal del lote la técnica de la intradermorreacción comparativa con PPD bovina y PPD aviar el primer día de la experiencia. Posteriormente se tuberculinizaron a cada animal del lote a la segunda, cuarta, sexta, octava y décima semana de la primera, mediando entre ellas un período de intertuberculinización de dos semanas.

- LOTE 2.-Se realizó a cada animal del lote la técnica de la intradermorreacción comparativa con PPD bovina y PPD aviar el primer día de la experiencia, una segunda dosis se inoculó a la cuarta semana de la primera y una tercera inoculación a las ocho semanas de la primera. El período de intertuberculinización fue de 4 semanas.

- LOTE 3.- Se realizó a cada animal del lote la técnica de la intradermorreacción comparativa con PPD bovina y PPD aviar el primer día de la experiencia, una segunda dosis se inoculó a la sexta semana de la primera. El período de intertuberculinización fue de 6 semanas.

- LOTE 4.- Se realizó a cada animal del lote la técnica de la

intradermorreacción comparativa con PPD bovina y PPD aviar el primer día de la experiencia y fue repetida ocho semanas después. El período de intertuberculinización fue de 8 semanas.

- LOTE 5.- Se realizó a cada animal del grupo la técnica de la intradermorreacción comparativa con PPD bovina y fue repetida diez semanas después. El período de intertuberculinización fue de 10 semanas.

- LOTE 6.- Se realizó a cada animal del lote la técnica de la intradermorreacción comparativa con PPD bovina y PPD aviar el primer día de la experiencia.

- LOTE TESTIGO. Se realizó a cada animal una medición del grosor de la piel del lado derecho e izquierdo en el primer día de la experiencia, 2ª, 4ª, 6ª, 8ª y 10ª semana.

Esta experiencia queda representada en la Tabla III.

Los animales de este grupo pertenecían a la Agrupación Caprina Canaria de la explotación del Cabildo Insular de Lanzarote. Dicha explotación se caracteriza por un régimen intensivo, compuesta por 100 animales, dos ordeños diarios, desparasitada .

Igualmente han servido para investigar en suero la evolución de anti-IgG frente al antígeno MPB70 y A60 mediante la técnica ELISA antes y después de cada tuberculinización. Hemos elegido este rebaño al considerarse a Lanzarote como una isla con una baja si no nula prevalencia de la tuberculosis caprina, y concretamente en este rebaño desconocerse desde siempre historia clínica de la enfermedad, ni sospecha alguna de la misma.

- GRUPO 3.- Hemos utilizado este grupo descrito anteriormente en el apartado 2.1. de Material y Métodos. En ellos hemos realizado una intradermorreacción comparativa cervical con PPD bovina y PPD aviar. Los animales 1,2,3 y 4, fueron tuberculinizados de forma repetida los días 1, 7, 14 y 28 de la experiencia. Antes de cada tuberculinización se realizó una toma de sangre y una medición del grosor de la piel de cada uno de ellos. Posteriormente tras dicha intradermorreacción se volvió a tomar muestras de sangre y lectura de la tuberculina a las 48 h. El animal número cinco sirvió de control durante toda la experiencia. No se realizó en este intradermorreacción alguna pero sí controles de grosor de la piel y toma de sangre al mismo tiempo que en el resto de los animales (Tabla II).

2.3.- PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 3º.

En la encuesta serológica de tuberculosis se consideró la población caprina de las islas de Lanzarote y Gran Canaria.

El censo caprino de la isla de Gran Canaria registrado en el año 1991 se cifra en 40.100 animales y el de la isla de Lanzarote en el mismo año es de 10.600 animales (LOPEZ y cols., 1993).

Una vez que hemos aplicado la técnica de muestreo estadístico (aptd. 3.6 de Material y Métodos), el tamaño de la muestra fue de 570 cabras de Lanzarote y 780 de Gran Canaria. A estos animales que fueron seleccionados al azar se les extrajo sangre que posteriormente fue desuerada y mantenida congelada en viales a -20°C hasta el momento de su análisis.

3.- METODOS

3.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS

Hemos procesado microbiológicamente muestras de 2 caprinos positivos a la tuberculina, pertenecientes al Grupo 1 (Tabla II). Todos los animales del grupo dieron resultados negativos a la técnica de diagnóstico "intradermorreacción tuberculínica con PPD aviar pero positivos a la misma con PPD bovina, tal como muestra la tabla IV.

Solamente pudimos procesar microbiológicamente a dos animales (5885 y 5838 de las Tablas IV y IX), debido a que el resto de los mismos fueron sacrificados sin previo aviso. Los caprinos sacrificados en el matadero Municipal de Las Palmas, fueron sometidos a una rigurosa inspección de la canal, ganglios, y vísceras. Tras la misma se pusieron de manifiesto lesiones en esófago en ambas, posiblemente de naturaleza parasitaria.

Cada muestra individual fue sometida a los siguientes pasos:

- Descontaminación

- Bacterioscopia por el método de Ziehl-Neelsen
- Aislamiento sistemático de las muestras en medios Löwenstein Jensen con piruvato y sin piruvato.
- Identificación bioquímica de las cepas obtenidas.

Todo el material de laboratorio que se utilizó fue previamente esterilizado en autoclave a 120°C, 15 minutos.

3.1.1.- Descontaminación

Se realizó mediante el método de Petroff descrita por RODRIGUEZ y cols. (1982).

- Se abre la lesión con las máximas condiciones de esterilidad
- Se realiza un raspado de las paredes de la misma (una vez eliminado el caseum).
- Homogeneizar la muestra, para lo cual se utilizó un homogeneizador manual (POBEL)
- Colocar la muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga.
- Adicionar un volumen igual de sosa al 1 % (Ver apdo. 4.1.1.1 de Material y Métodos) y agitar hasta conseguir un homogeneizado. Nos hemos ayudado mediante un homogeneizador manual (POBEL).
- Dejar a temperatura ambiente 15 minutos.
- Adicionar agua destilada estéril hasta unos tres centímetros de altura del tubo. Esto reduce la densidad de la solución y diluye el exceso de sosa.
- Neutralizar la solución con ácido sulfúrico al 1 % (Ver apdo. 4.1.1.2 de Material y Métodos)
- Centrifugar a 2000 rev/min durante 20 minutos.
- Decantar el sobrenadante.
- Sembrar dos o tres gotas de precipitado en medios de Lowenstein con piruvato y sin piruvato sódico.
- Preparar un frotis de 2x2 cm para tinción mediante Ziehl-Neelsen. Este método fue empleado sólo de modo indicativo pues todos los resultados se basaron en el aislamiento de la micobacteria. Ver reactivos en apdo. 4.2.1 de Material y Métodos.

3.1.2.- Aislamiento

Los medios de cultivo (Ver apdo. 4.1.2.1. y 4.1.2.2 de

Material y Métodos) se colocaron en gradillas inclinadas y con el tapón semienroscado a 37°C (estufa SELECTA) durante los cinco días siguientes, con el fin de conseguir la evaporación del exceso de líquido y se anotó en el libro de control el día de siembra de cada caso, siguiendo las indicaciones de M. CASAL (1990).

Transcurrido dicho período los cultivos se colocaron en posición vertical y se atornillaron las roscas completamente y siguieron incubándose a 37°C.

Cada tres días se realizaba un control de crecimiento. Una vez crecida la cepa se anotó la fecha. Aquellos en los que no se obtuvo crecimiento durante los tres meses y medio posteriores a la siembra se consideraron negativos.

3.1.3.- Identificación

Una vez crecido el cultivo teniendo como mínimo cuatro semanas de incubación se procedió a su identificación:

3.1.3.1.- Morfológica

Por medio de un Ziehl Neelsen confirmativo.

3.1.3.2.- Bioquímica

Hemos realizado aquellas reacciones bioquímicas que consideramos imprescindibles para la caracterización de la micobacteria. Para ello nos hemos servido de la descripción de las mismas por la bibliografía especialmente diseñada para las micobacterias (WAYNE y cols., 1974; WAYNE y cols., 1976; WAYNE Y DIAZ, 1982), tal como se puede ver en la Tabla V.

3.1.3.2.1.- Velocidad de crecimiento

Los cultivos fueron observados cada tres días durante la 1ª

semana y posteriormente cada semana. Los cultivos que muestran crecimiento en menos de siete días corresponden a micobacterias de crecimiento rápido. Una vez se aprecia el inicio del crecimiento se anotó la fecha.

3.1.3.2.2.- Reducción de nitratos

Se preparó "Bacto nitrate broth" (DIFCO) (Ver apdo. 4.3.1.1 de Material y Métodos). Se repartieron 10 ml del caldo por tubo de ensayo. Se suspendió en el mismo colonias de la bacteria a identificar mediante un asa de platino procurando un inóculo suficiente, y se incubó a 37°C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo se procedió a añadir cinco gotas de reactivo sulfanílico (Ver apdo. 4.3.1.2 de Material y Métodos) y otras cinco de alfa-naftilamina (Ver apdo. 4.3.1.3 de Material y Métodos).

Positivo: color rosa claro a rojo oscuro

Negativo: ausencia de color rosa

3.1.3.2.3.- Producción de Catalasa

Se realiza a pH 7, tanto a 68°C como a temperatura de laboratorio.

- Con una pipeta estéril se pone 0.5 ml de tampón fosfato 15 M, pH 7 (Ver apdo. 4.3.2.3 de Material y Métodos) en dos tubos de ensayo a rosca 16x135 mm.
- Con un asa se toma la masa bacteriana del medio sólido y se emulsiona en el tampón.
- Se coloca uno de los tubos en un baño maría caliente a 68°C durante 20 minutos. Se deja el segundo tubo a temperatura ambiente.
- Retirar los tubos del baño maría y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 0.5 ml de la mezcla de tween 80 (Ver apdo. 4.3.2.2 de Material y Métodos) y agua oxigenada (Ver apdo. 4.3.2.1 de Material y Métodos) en cada tubo.
- Se debe observar la formación de burbujas sobre la superficie del

líquido. Esperar unos 30 minutos antes de considerar el resultado como negativo. Asimismo ha de anotarse el tamaño de las burbujas.

3.1.3.2.4.- Hidrólisis del tween-80

- Añadir con la ayuda de un asa de platino una cierta cantidad de bacterias al sustrato (Ver apdo.4.3.3 de Material y Métodos) y emulsionarlo.
- Poner en la estufa a 37°C

La aparición de un color rosa en el líquido indica una reacción positiva.

Las lecturas deben hacerse a las 24 horas, 5 días y 10 días.

3.1.3.2.5.- Crecimiento en presencia de TCH (hidracida del ácido tiocarboxílico).

Se siembra el medio de Löwenstein-Jensen con TCH (Ver apdo. 4.1.2.3 de Material y Métodos) a partir de un cultivo reciente del microorganismo que ha de identificarse. Se toman algunas colonias y se emulsionan en un tubo estéril que contenga bolitas de cristal y 2 ó 3 mililitros de agua destilada estéril. Se agita para obtener una emulsión completa, que deberá ser bastante densa. Inocular un tubo de Löwenstein-Jensen de referencia sobre el que ha crecido bien la micobacteria y sembrar una cantidad igual de esta emulsión en un Löwenstein con TCH. Se dejan los tubos inclinados durante 48 horas y se incuban a 37°C. Pasado este tiempo se vuelven a poner en posición vertical

Lectura.-

Se observarán periódicamente los tubos que, en el caso de *M. bovis* no deben contener ningún crecimiento en TCH o solamente un número de colonias muy inferior al del testigo.

3.1.3.2.6.- Producción de Niacina

- Añadir 1.5 ml de agua destilada o solución salina a un cultivo de unas cuatro semanas, mostrando buen crecimiento. No usar cultivos contaminados que muestren declives "azulados o pálidos"
- Inclinar los tubos en el autoclave para que la superficie del medio esté horizontal y cubierta con el líquido.
- Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 1.5 atmósfera de presión (121°C).
- Después los tubos se enfrían, permaneciendo verticalmente durante 10 minutos para permitir que las partículas del medio se asienten.
- Remover aproximadamente 0.6 ml de extracto con una pipeta capilar ajustada con un bulbo, y transferir al fondo de un tubo de 13x75 ml.
- Se utiliza también un tubo control negativo conteniendo 0.6 ml de la misma solución salina o agua destilada como fue usada en la extracción del cultivo.
- Introducir una tira para detectar la producción de niacina tanto en el tubo problema como en el control negativo.
- Lectura: la aparición de un color marrón en la tira sería positivo.

Frente a cada técnica usada se utilizaron controles negativos constituidos por los mismos reactivos empleados sin incluir la micobacteria o extracto micobacteriano alguno, según los casos.

3.2.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Las cinco cabezas de ganado caprino del Valle de Agaete (Las Palmas) con lesiones caseosas localizadas en ganglios mamarios o preescapulares (Grupo 3 Tabla II), descritos anteriormente en el apartado 2 de Material y Métodos, fueron procesados al terminar la experiencia de tuberculinización para constatar la infección por esta bacteria. Tras haber rasurado y desinfectado la zona se procedió a realizar una anestesia local con "Xilocaína" (Laboratorio Ovejero).

Una vez anestesiada la zona se abrió la lesión y se extrajo el caseum que se colocó en frascos estériles y fueron transportados en refrigeración hasta el laboratorio en donde fueron procesados microbiológicamente.

3.2.1.- Aislamiento

- Con la ayuda de un asa de platino se tomó material patológico y se sembró en placas de Agar sangre (Ver apdo. 4.1.2.4.).
- Las placas se colocaron en estufa a 37°C durante 48 horas y aerobiosis.

3.2.2.- Identificación

Una vez crecido el cultivo teniendo como mínimo 48 h, se procedió a su identificación:

3.2.2.1.- Morfológica

Por medio de un Gram confirmativo, en el que han de observarse cocobacilos gram positivos.

3.2.2.2.- Método bioquímico

Se coloca en un porta una gota de agua oxigenada (3 %) y con la ayuda de un asa de siembra se extiende sobre la misma una pequeña cantidad de colonias.

Lectura.- Formación de burbujas, catalasa positivo (*Corynebacterium pseudotuberculosis* es catalasa positivo).

La bioquímica restante se realizó con la ayuda de la galería de identificación Api CORYNE (BIO-MERIEUX, Ref.07030A, C/ Manuel Tovar, nº 36, Apto. 28034-MADRID), las reacciones realizadas con la misma han sido: reducción de nitratos, pirazinamidasas, pirrolidonoil aril-amidasas, fosfatasa alcalina, beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, alfa-glucosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa, esculina beta-glucosidasa, hidrólisis de la gelatina, fermentación de azúcares (glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa) y reacción de la catalasa. Las técnicas de la hemólisis sinérgica e inhibición de la β -hemolisina estafilocócica fueron realizadas según el protocolo descrito por F. REAL y cols. (1990)

3.2.2.3.- Técnicas complementarias

3.2.2.3.1.- Hemólisis sinérgica

Producida entre *Rhodococcus equi* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* en agar sangre. De *Rhodococcus equi* se utilizó la cepa 555 enviada desde el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia .

3.2.2.3.2.- Inhibición de la β -hemolisina estafilocócica.

Inhibición de la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. De *Staphylococcus aureus* hemos utilizado una cepa de campo aislada e identificada previamente en nuestro laboratorio a partir de una mamitis clínica de una cabra.

3.3.- DESARROLLO DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70

3.3.1.- Comprobación del nivel de pureza del antígeno MPB70

- El antígeno MPB70: Proteína aislada y purificada, mediante filtración sin calentamiento de un cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Tokio 172). MPB70 está descrito por M. HARBOE y cols. (1990) como una proteína altamente específica de *M. bovis* la cual es producida durante su cultivo. Nos fue suministrada por el Dr. Sadamu Nagai (Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City. University Medical School, Toneyama 5-1-1, Toyonaka, Osaka 5600). Antes de desarrollar la técnica hemos comprobado el nivel de pureza del antígeno MPB70.

La pureza ha sido evaluado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Se ha usado una cubeta de electroforesis vertical BIORAD, modelo mini-Protein II xi Slab Cell. El protocolo de la técnica es el indicado por HARLOW y LANE (1988).

- Ensamblar los cristales
- Preparar el gel separador (Ver apdo. 4.4.9 de Material y Métodos), colocarlo entre las dos placas de cristal evitando la formación de burbujas, hasta aproximadamente 1.5 cm del cristal más bajo.
- Dejar reposar 20-30 minutos
- Colocar el gel concentrador (Ver apdo. 4.4.10 de Material y Métodos) y luego el peine y dejar reposar 10 minutos.
- Calentar las muestras a analizar (MPB70 y patrón control) en el disolvente de la muestra (Ver apdo. 4.4.6 de Material y Métodos), a la proporción 1/1, a una temperatura de 85°C durante 10 minutos.
- Colocar la muestra de MPB70 en un pocillo de los que quedan al retirar el peine. En otro de los pocillos se coloca un patrón.
- Arrancar la electroforesis a 150 V. y 20 mA.
- Vigilar la migración de las proteínas y parar la migración una vez transcurridas cuatro horas y media .
- Desmontar los cristales y con sumo cuidado para que no se rompa el gel. Colocar el mismo en una cubeta que contiene la solución de tinción (Ver apdo. 4.4.7 de Material y Métodos). Incubar durante 4 horas o toda la noche en agitación.
- Colocar el gel en la solución decolorante hasta que las bandas proteicas se observaron de forma nítida (Ver apdo. 4.4.8 de Material y Métodos).
- Fotografiar el gel.
- Colocar el negativo de la fotografía en un densitómetro de Pharmacia Biotech S.A. (Fast Sistem, ULTROSCAN XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB-BROMMA,) conectado a una impresora. Al ponerlo en marcha quedarán impresos en papel dos gráficas enfrentadas, correspondiendo los picos de la representación superior a las proteínas del patrón proteico y la representación inferior a la proteína en estudio, picos que se corresponden con cada una de las bandas del gel de la electroforesis.
- Por último calcular el índice de retención (Rf) de cada pico, según la fórmula

$$Rf = \frac{Dx}{Dt}$$

Dx = distancia medida en centímetros desde el origen de la base del frente hasta la base de la proteína en cuestión, de las cuales se conocen sus pesos moleculares.

D_t = distancia medida en centímetros desde el origen de la proteína de peso más bajo hasta el pico descrito por el frente.

Así se llegan a obtener seis índices de retención correspondientes a cada una de las proteínas del patrón y un séptimo que correspondería a la proteína MPB70.

Luego se transforman los pesos moleculares de las proteínas patrón en base logarítmica. A tal efecto los pesos moleculares que vienen expresados en Kilodaltons hemos primero de pasarlos a daltons.

Se representan en un gráfico valores logarítmicos frente a los índices de retención, para obtener una recta. En el eje de abscisas, se representan los índices de retención. Los logaritmos de los pesos moleculares se representan en eje de ordenadas.

Confección de la curva de calibrado: La curva de calibrado no es más que una relación matemática entre el log PM (logaritmo del peso molecular de cada banda) frente al índice de retención de cada banda, para el patrón. En el eje Y representamos log Pm y en el eje X representamos los índices de retención, Rf.

Normalmente dicha relación es lineal, es decir, los puntos experimentales (log Pm y Rf) se acercan con gran aproximación a una línea recta, $\log P_m = a + b \cdot R_f$ o bien $\log P_m = a - b \cdot R_f$. Hoy en día, con el importante desarrollo de los procesos automatizados de cálculo (ordenador y programas), hay en el mercado una gran profusión de programas de cálculo que incluyen dentro de otros muchos apartados el cálculo antes mencionado. Nosotros hemos utilizado el programa TBCURVE (JANDEL SCIENTIFIC, 1989-90). Así obtendremos el Pm del MPB70.

3.3.2.- Técnica ELISA con antígeno MPB70

Se realizó la técnica ELISA con antígeno MPB70 con finalidades distintas.

I.- Se analizaron con esta técnica ELISA, los sueros de: 32 caprinos infectados con *M.bovis*, 15 con *M.avium subsp. paratuberculosis* y 5 por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Grupo 1,2 y 3 Tabla II) .

II.- Se realizó también esta técnica a los sueros de los animales tras sucesivas tuberculinizaciones, tanto al grupo aparentemente sano (Grupo 4 Tabla II y III) como al enfermo de pseudotuberculosis (Grupo 3 Tabla II).

III.- También hemos procesado, 570 sueros de caprino de las islas de Lanzarote y 780 de Gran Canaria. La recogida de sueros fue realizada mediante muestreo aleatorio siguiendo criterios básicos, con el fin de medir la prevalencia de la infección por *M. bovis* en la cabaña caprina de ambas islas (Tabla I, XV, XVI, XVII y XVIII).

Para la estandarización de esta técnica hemos seguido las indicaciones de SANCHEZ y CAMBRA (1987) y M. HARBOE y cols. (1990).

3.3.2.1.- Variables investigadas para la estandarización de la técnica

Se ensayaron concentraciones de 0.5 μg y de 3 μg de antígeno MPB70.

Cada una de estas concentraciones de antígeno las enfrentamos a distintas diluciones de los sueros testigos positivos y negativos. Las diluciones de los sueros ensayadas fueron: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. Cada una de estas se ensayaron con distintas diluciones de conjugado: 1:1000, 1:3000, 1:5000 y 1:10000.

3.3.2.2.- Técnica estandarizada

- Antigenar la placa de microtitulación de la técnica ELISA (Lot. 90H 8990. BIOSIGMA. CHEMICAL USA) completa con 0,5 μg de antígeno MPB70 por pocillo. EL antígeno se eluye en PBS unidor (Ver apdo. 4.5.2.1.3 de Material y Métodos). Colocar 100 μl de la dilución (conteniendo 0,5 μg del antígeno) por pocillo. Incubar 48 horas a 4°C.
- Lavar 3 veces la placa con PBS lavador (Ver apdo. 4.5.2.1.2. de Material y Métodos)
- Bloquear toda la placa con PBS bloqueador (Ver apdo. 4.5.2.1.4 de Material y Métodos) 100 μl por pocillo.

Incubar 30 minutos a 37°C

- Lavar 3 veces la placa con PBS lavador.
- Colocar 100 μ l de cada suero problema diluido al 1/50 en PBS bloqueador por pocillo. Respetar dos pocillos centrales para colocar los testigos positivos y negativos diluidos también al 1/50. (2 μ l suero en 98 μ l PBS bloqueador).

Respetar los ocho pocillos de la primera columna en el cual no se colocará ningún suero sino 100 μ l/pocillo de PBS bloqueador. Esta columna hará de "blanco" y se procesará igual en los sucesivos pasos del método.

Incubar 30 minutos a 37°C.

- Lavar 3 veces con PBS lavador.
- Respetando la columna "blanco" que se trabajará como la vez anterior, se coloca en el resto de los pocillos 100 μ l/pocillo de un suero de conejo anti IgG de cabra conjugado con peroxidasa (SIGMA) diluida al 1/3000 en PBS bloqueador.

Incubar 30 minutos a 37°C.

- Lavar 3 veces con PBS lavador.
 - Colocar 100 μ l/pocillo de una solución de ortofenildiamina (Ver apdo. 4.5.2.2.1 de Material y Métodos) excepto en la columna "blanco".
 - Incubar 10 minutos a 37°C.
 - Parar la reacción mediante una solución de ácido sulfúrico en un volumen de 50 μ l en cada pocillo de la solución de parada (Ver apdo. 4.5.2.3.1 de Material y Métodos). Respetando la columna blanco a la cual se añadirá 50 μ l de PBS bloqueador.
- La lectura se realizará en el lector de placas (Whittaker, bioproducts, EIA 400 FW, MOD:15 885) a 405 nm.

Hay que tener la precaución de antigenar las placas en el momento de usarlas, y el antígeno diluido sobrante se inactiva con la congelación por lo que habrá que desecharlo.

En cada placa se incluyó un suero control positivo a *M. bovis* y otro negativo SPF. El control positivo fue seleccionado del grupo de animales tuberculino positivo a PPD bovina, tras sacrificio de dos animales, en los que se comprobó la infección microbiológicamente, con aislamiento de *M. bovis*. Como control negativo se tomó un suero SPF (libre de patógenos específicos), que nos fue remitido desde el Moredun Research Institute, Edimburgo, UK.

3.4.- DESARROLLO DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO A60

- Antígeno A60: Las micobacterias poseen varios componentes inmunológicamente activos. El Antígeno 60 es un miembro del grupo de los antígenos macromoleculares (10^6 - 10^7 daltons) y termoestables, siendo el principal componente del PPD. Es capaz de estimular una respuesta inmunológica tanto de tipo humoral como celular.

El Antígeno ha sido extraído del citoplasma del *M. bovis* BCG y purificado por cromatografía en gel-117 (Pharmacia) (COCITO y VALINDEN, 1986).

Se aplicó esta técnica a los siguientes grupos.

I.- Se sometieron a esta técnica ELISA, los sueros de: 32 caprinos infectados con *M. bovis*, 15 con *M. avium subsp. paratuberculosis* y 5 por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Grupos 1, 2 y 3 de la Tabla II).

II.- Se realizó también esta técnica a los 21 sueros de los animales tuberculinizados del grupo libre de infección por *M. bovis* (Grupo 4 Tabla II y Tabla III), y al grupo de animales infectado de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis* el cual fue sometido a sucesivas tuberculinizaciones (Grupo 3 Tabla II).

Con este método ELISA pretendemos comparar sus resultados con los obtenidos de enfrentar estos mismos sueros al antígeno MPB70 y observar si este último resulta más fiable detectando infección por *M. bovis* en ganado caprino, tal como describe M. HARBOE y cols. (1990) para ganado vacuno en ganado infectado artificialmente.

La técnica ELISA con antígeno A60 se llevó a cabo según la metodología descrita por C. COCITO y cols. (1987), con algunas modificaciones:

- Variables investigadas para la estandarización de la técnica.

- Los sueros fueron diluidos en PBS (Ver apdo. 4.5.2.1.1 de Material y Métodos) al 1/50, en vez de al 1/100 que es la que recomienda la casa Biosell para el diagnóstico de paratuberculosis,

ya que fue la dilución óptima recomendada por dichos laboratorios para trabajar en tuberculosis.

- El conjugado fue diluido al 1/3000, dilución obtenida tras estandarización.

-Técnica estandarizada:

- Las placas antigenadas con 0.6 μg /pocillo compradas a la casa Biosell (Placas antigenadas con antígeno A60, Lote 92.10.13. ANDA. BIOSELL. STRASBOURGO) se hidrataron con 100 μl /pocillo de PBS (Ver apdo.4.5.2.1.1 de Material y Métodos).

Incubar 1 horas a 37°C.

- Lavar 6 veces la placa con PBS .

- Colocar 100 μl por pocillo de cada suero problema diluido al 1/50 en PBS. Respetar dos pocillos centrales para colocar los testigos positivos y negativos diluidos también al 1/50. (2 μl de suero en 98 μl de PBS).

Respetar los ocho pocillos de la primera columna en el cual no se colocará ningún suero sino 100 μl / pocillo de PBS. Esta columna hará de "blanco" y se procesará igual en las sucesivas etapas del desarrollo de dicha técnica diagnóstica.

Incubar 45 minutos a 37°C.

- Lavar 6 veces con PBS.

- Respetando la columna "blanco" que se trabajará como la vez anterior, se coloca en el resto de los pocillos 100 μl / pocillo de suero de conejo anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa diluida al 1/4000 en PBS (Lot.90H8990. BIOSIGMA. CHEMICAL. USA.).

Incubar 30 minutos a 37°C.

- Lavar 6 veces con PBS.

- Colocar 100 μl / pocillo de ortofenildiamina (Ver apdo. 4.5.2.2.2 de Material y Métodos). Respetando columna "blanco" que se trabaja como se ha especificado anteriormente.

- Incubar 10 minutos a 37°C.

- Parar la reacción añadiendo a cada pocillo 100 μl de la solución de ácido sulfúrico (Ver apdo. 4.5.2.3.2 de Material y Métodos).

Respetando la columna blanco a la cual se añadirá 100 μl de PBS.

La lectura se realizará en un lector de placas (WHITTAKER, BIO-PRODUCTS, EIA 400 FW, MOD. 15885) utilizando el filtro de 492 nm.

Esta técnica ELISA se desarrolló con los mismos controles (positivo y negativo) utilizados en el desarrollo del apartado 3.3 de Material y Métodos.

3.5.- CALCULO DEL ESTIMADOR KAPPA (MARTIN y cols., 1987)

En la práctica los epidemiólogos frecuentemente tienen que utilizar métodos imperfectos para las cuales no existen estimadores cuantitativos de especificidad y sensibilidad. Bajo estas circunstancias cuando se desarrolla una nueva técnica para el diagnóstico de una infección o enfermedad, sus resultados se comparan frecuentemente con aquellos de otra técnica diagnóstica estándar, y en ocasiones imperfecta.

Una medida del nivel de acuerdo entre ambas es calcular el porcentaje de acuerdo observado entre ellas.

La seguridad cualitativa de Kappa sugiere que si es alta ambas técnicas diagnósticas están midiendo con una buena fiabilidad los resultados para las que fueron diseñadas. En la comparación de técnicas una kappa de 0.4-0.5 indica moderado nivel de acuerdo.

Para el cálculo de Kappa hemos de realizar la tabla de contingencia siguiente

	Técnica estándar	
Técnica nueva	+	-
+	a	b
-	c	d

Hay que calcular la prevalencia aparente para cada una de las técnicas. Así como la prevalencia se define como la cantidad de enfermedad en una población en un determinado tiempo, la prevalencia aparente para la técnica estándar sería:

$$P_1(+) = \frac{a + c}{a + b + c + d}$$

y la prevalencia aparente del nuevo método diagnóstico sería:

$$P_2(+)=\frac{a+b}{a+b+c+d}$$

Seguidamente hemos de calcular la proporción de concordancia entre ambos métodos, o sea la concordancia real (CR) entre ambas no debida al azar, tanto en positivos como en negativos, por lo que sería

$$CR = (a + d) / \text{número total de individuos}(a + b + c + d).$$

Hemos de calcular también la concordancia debida al azar, para ello hemos de conocer previamente la probabilidad de positivos de común acuerdo entre los dos métodos de diagnóstico PC(+) y la probabilidad de negativos de común acuerdo PC(-). La probabilidad de positivos para cada método viene dada por la prevalencia aparente, por lo que el producto de dichas probabilidades nos daría la probabilidad de positivos de común acuerdo, $PC(+) = P_1(+)\times P_2(+)$. La probabilidad de negativos para cada una de las técnicas las tendríamos que calcular:

La probabilidad de resultados negativos para el método estándar sería:

$$P_1(-)=\frac{b+d}{\text{n}^\circ \text{ total de individuos}}$$

La probabilidad de negativos para el nuevo método de diagnóstico sería:

$$P_2(-)=\frac{c+d}{\text{n}^\circ \text{ total de individuos}}$$

Por lo que la probabilidad de negativos de común acuerdo entre ambas técnicas diagnósticas sería el producto de las probabilidades, o sea, $PC(-) = P_1(-)\times P_2(-)$.

Así la concordancia entre ambos métodos debida al azar (CA) resulta de la suma de la probabilidad de común acuerdo de positivos

y la probabilidad de común acuerdo de negativos, $PC(+) + PC(-) = CA$.

Una vez conocida la concordancia real (CR) y la debida al azar (CA), podemos calcular el estimador Kappa (κ). Para ello hemos de conocer la mínima probabilidad de común acuerdo entre ambas técnicas, por lo que ha de restarse la CR de la CA, sabiendo que el valor máximo que puede tomar una probabilidad es 1, la máxima probabilidad de común acuerdo resulta de $1 - CA$.

Kappa, nos daría si existe concordancia entre ambas técnicas o la concordancia entre ambas es meramente debida al azar,

$$\kappa = \frac{\text{mínima probabilidad de común acuerdo}}{\text{máxima probabilidad posible}}$$

Kappa puede tomar valores entre -1 y 1, lo que se interpretará de la siguiente manera:

- Un valor de κ negativa, quiere decir que la concordancia real es menor que la debida al azar, o sea, la existencia de concordancia es debida al azar y las técnicas dan resultados contradictorios. Las técnicas de diagnóstico son discordantes.

- Un valor de κ positiva, se interpreta como que existe una concordancia o relación entre los resultados obtenidos con ambos métodos. Conforme kappa se va acercando al valor 1, o sea, máximo valor de una probabilidad, mayor relación existiría entre ambos métodos de diagnóstico.

3.6.- INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA COMPARATIVA

Para el desarrollo de la experiencia se utilizó el grupo de 21 animales libre de infección por *M. bovis* (Grupo 4 Tabla II, Tabla III) y el lote de 5 animales con infección natural por *C. pseudotuberculosis* (Grupo 3 Tabla II). Estos últimos fueron tuberculinizados los días 1, 7, 14 y 28 de la experiencia (detallado en material y métodos apdo 2).

Utilizamos para el desarrollo de esta técnica el siguiente material:

- Tuberculina PPD aviar (Lot. 917.COOPER ZELTIA. PORRIÑO 25000 UI/ml).
- Tuberculina PPD bovina- (Lot. 912.COOPER ZELTIA. PORRIÑO 75000 UI/ml).
- Jeringuillas de insulina
- Cutímetro
- Peladora (HAUPINER), manual.

Procedimos en lo que se refiere a la dosis a inocular por animal de cada una de las PPD siguiendo las indicaciones de la normativa comunitaria europea (HAAGSMA, 1986) y la lectura se realizó siguiendo las indicaciones de SHAROV, 1986.

Procedimiento:

- Rasurado en las tablas del cuello tanto derecha como izquierda
 - Toma de sangre de cada una de las cabras previo a cada tuberculización y en el momento de cada lectura. Dicha sangre será posteriormente desuerada y enfrentada al antígeno MPB70 mediante el método ELISA indirecto con el fin de valorar el título de anticuerpos frente al antígeno MPB70.
 - Con la ayuda de un cutímetro medimos el grosor de la piel de ambos lados y anotamos en el cuaderno de control.
 - Basándonos en el esquema (Tabla III) en el caso del caprino exento de infección por *M.bovis* y en el caso del grupo infectado de forma natural por *C.pseudotuberculosis* procederemos tal como ya se indicó en el apdo. 2.2. GRUPO 3 de Material y Métodos, inocular a los animales correspondientes 7500 U.I. (0'1 ml) de PPD bovina y 2500 U.I.(0'1 ml) de PPD aviar, con jeringuilla de insulina.
- La fecha de tuberculización de los animales quedará anotada
- A las 48 horas postinoculación, siguiendo las indicaciones de SHAROV (1986), se volverá a medir con el cutímetro el grosor de la piel, de tal forma que cada lectura quede perfectamente identificada con la tuberculina inoculada y el animal al que corresponde.

Contaremos con un lote testigo (en ambas experiencias) de animales que en ningún momento se inocularán con tuberculina, y que servirá como lote control de tuberculización en cada fase.

3.7.- METODO DE MUESTREO PARA LOS SUEROS DE LAS ISLAS DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE

Hemos realizado una encuesta para estimar la prevalencia de tuberculosis caprina por *M.bovis* en las islas de Gran Canaria y Lanzarote.

Para ello realizamos un muestreo probabilístico en el que la selección de la muestra se realizó mediante un proceso aleatorio, el cual permite que dentro de cada grupo cada animal tenga la misma probabilidad de ser seleccionado.

La isla de Gran Canaria con un total de 21 municipios (Agaete, Agüimes, Artenara, Arucas, Firgas, Gáldar, Ingenio, Mogán, Moya, Las Palmas de Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana, San Nicolás de Tolentino, Santa Brígida, Santa Lucía de Tirajana, Santa María de Guía, Tejeda, Telde, Teror, Valsequillo de Gran Canaria, Valleseco y Vega de San Mateo) y Lanzarote con tan solo 7 municipios (Arrecife, Haría, San Bartolomé, Tegüise, Tías, Tinajo y Yaiza).

Hemos utilizado un tipo de muestreo aleatorio estratificado, en el que el primer estrato quedó representado por las islas de Gran Canaria y Lanzarote. Un segundo estrato estuvo constituido en la Isla de Gran Canaria por *n* animales extraídos de forma aleatoria de cada una de las islas mencionadas, en el que procuramos que todos los municipios con censo caprino no exiguo estuvieran representados y escogidos igualmente de forma aleatoria, con independencia del sistema de explotación o las características climáticas de cada área. Nos hemos basado en el censo de ganado caprino existente en el año 1991 (LOPEZ y cols., 1993). En esta isla se seleccionaron 56 explotaciones localizadas preferentemente en zonas costeras de la isla. El total de animales analizados fue 780, que representan una población de estudio de 12.388 animales. En la isla de Lanzarote se seleccionaron un total de 64 explotaciones, casi el total de explotaciones existentes en la isla, resultando un total de animales analizados de 570, que representan una población de estudio de 7.014 animales. Dichas explotaciones fueron seleccionadas al azar dentro de cada Término Municipal.

El tamaño de la muestra lo hemos realizado siguiendo las indicaciones de CANNON Y ROE (1982) (cit. M.THRUSFÍELD, 1990). Escogimos para nuestro estudio un nivel de confianza del 95 % y

una precisión del 5 %, con una estimación supuesta de prevalencia esperada del 50 %, aunque realmente este valor es muy superior a la prevalencia realmente esperada, pero al no existir datos previos a nuestro estudio nos vemos obligados a trabajar con una muestra grande. De esta forma obtenemos que nuestra muestra ha de tener como mínimo 384 animales .

El número de animales escogidos al azar en cada explotación lo obtuvimos aplicando la "tabla Internacional de Muestreo" (American - British -Canadian), nivel normal, teniendo en cuenta que este sistema nos permite seleccionar un tamaño de muestra muy superior al que necesitamos (Tabla I).

Hemos calculado la prevalencia (P) según M. THRUSFIELD (1990), la cual mide la cantidad de infección presente en una población conocida durante un período de tiempo determinado, sin distinguir los casos nuevos de los antiguos. Es una proporción que representa la probabilidad de que un animal tenga una infección específica en un momento dado.

$$P = \frac{\text{Número de animales que presentan la infección en un período de tiempo concreto}}{\text{Número de individuos en riesgo de la población, en ese mismo período de tiempo}}$$

4.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVOS

4.1.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVOS EMPLEADOS EN TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.

4.1.1.- Solución descontaminante

4.1.1.1.- Solución de sosa al 1 % (NaOH)(Panreac).

- NaOH 1 g
- Agua destilada 99 ml

Esterilizar en autoclave

4.1.1.2.- Solución de ácido sulfúrico (SO₄H₂) al 1 % (Panreac).

- SO₄H₂ 1 ml
- Agua destilada 99 ml

Esterilizar en autoclave.

4.1.1.3.- Azul de Bromotimol

- Azul de bromotimol 12 mg
- Agua destilada 98 ml

Utilizada para descontaminar las muestras patológicas sospechosas de micobacteriosis, que han de ser cultivadas en Löwestein Jensen.

4.1.2.- Medios de cultivos

4.1.2.1.- Para *Mycobacterium spp.*

- Löwestein Jensen (BioMedics)
- " " con piruvato (BioMedics)
- " " con TCH (BioMerieux)

4.1.2.2.- Para *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

- Agar sangre: Blood agar base (DIFCO) adicionado con 7.5 % de sangre de oveja citratada (OXOID).

4.2.- TINCIONES

Tinción de Gram (Laboratorios DIFCO)

Tinción de Ziehl-Neelsen (Laboratorios DIFCO)

4.3.- SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE LAS MICOBACTERIAS AISLADAS

4.3.1.- Reacción de la reducción de los nitratos:

4.3.1.1.- Bacto nitrate broth (Laboratorio DIFCO)

- Extracto de carne 3 g
- Peptona 5 g
- Nitrato potásico 1 g

Rehidratar 9 g de la mezcla anterior en un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C.

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 30 minutos.

4.3.1.2.- Reactivo sulfanílico:

- Acido sulfanílico 0.8 g
- Acido acético 100 ml

4.3.1.3.- Reactivo alfa naftilamina:

- Alfa naftilamina 0.5 g
- Acido acético 100 ml

4.3.2.- Reacción de la catalasa

Se utilizó agua oxigenada al 3 % (de venta normal en farmacias).

4.3.2.1.- Solución al 10 % de Tween 80

- Agua destilada 90 ml
- Tween 20 (Merck) 10 ml

Esterilizar a 120°C durante 10 minutos. Guardar en frigorífico.

4.3.2.3.- Solución fosfato M/15 de pH 7:

Solución A: Fosfato disódico 15 M

- Fosfato disódico (Merck) . . . 9.47 g
- Agua destilada 1000 ml

Solución B: Fosfato monopotásico 15 M

- Fosfato monopotásico (Merck) 9.07 g
- Agua destilada 1000 ml

Mezclar 61,1 ml de la solución A con 38.9 ml de la solución B.

4.3.3.- Hidrólisis del tween 80:

Mezclar

- Tampón fosfato pH 7, 15 M 100 ml
- Tween 80 (Merck) 0.5 ml
- Rojo neutro (Panreac) 3 ml

El Tween 80 debe diluirse antes de añadir la solución de rojo neutro.

- Distribuir 2 ml en tubos de ensayo de rosca estériles.
- Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 120°C. El líquido debe quedar color ámbar.
- El sustrato se conserva unas dos semanas. Debe conservarse en la oscuridad y en frigorífico.

4.4.- SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) DEL ANTIGENO DE *M.bovis* BCG

4.4.1.- Solución madre de acrilamida/bis acrilamida

- Acrilamida (SIGMA) 11.52 g
- Bis-acrilamida (SIGMA) 0.32 g
- Agua destilada 40 ml

Filtrar por papel de filtro y conservar en fresco a 4°C, en un recipiente opaco. Su validez no se extiende a más de 30 días.

4.4.2.- Solución de SDS (sulfato-duodecil-sódico)

- SDS (Merck) 1 g
- Trizma base (SIGMA) 45.5 g
- Agua destilada 250 ml

Se agita lentamente, y se conserva a temperatura ambiente hasta su uso. Ajustar pH a 8.8. con CIH.

4.4.3.- Amonio persulfato

- Amonio persulfato (Merck) 0.5 g
- Agua destilada 5 ml

Conservar en fresco

4.4.4.- Solución concentradora

- SDS (Merck) 1 g
- Trizma base (SIGMA) 15.1 g
- Agua destilada 250 ml

pH 6.8 con CIH. Conservar en fresco a 4°C

4.4.5.- Solución reservorio

- Glicina (SIGMA) 28.8 g
- Trizma base (SIGMA) 6 g
- SDS (Merck) 2 g
- Agua destilada 2000 ml

Conservar en fresco

4.4.6.- Disolvente de la muestra

- SDS (Merck) 0.42 g
- β mercaptoetanol (SIGMA) . . . 2 ml
- Glicerol (Panreac) 4 g
- Trizma base (Sigma) 0.3 g
- Azul de bromofenol (Sigma)(0.1 % p/v) 2 ml
- Agua destilada 20 ml

pH 6.8 con ClH, conservar a 4°C

Dilución de las muestras al 1/1

4.4.7.- Tinción de geles

- Azul de Comássie R.250 (SIGMA) . . . 0.25 g
- Metanol (Panreac) 125 ml
- Ac acético glacial (Panreac) 25 ml
- Agua destilada 100 ml

Conservar en fresco

4.4.8.- Decolorante

- Metanol (Panreac) 100 ml
- Ac acético glacial (Panreac) 100 ml
- Agua destilada 800 ml

Conservar en fresco

4.4.9.- Gel separador

- Solución acrilamida/Bis acrilamida
(Ver apdo.4.4.1 de Mat. y Mét.) 15 ml
- Agua destilada 7.5 ml
- Solución amortiguador separador
(Ver aptd 4.4.2 de Mat. y Mét.) 7.5 ml
- Solución amonio persulfato
(Ver apdo. 4.4.3 de Mat. y Mét.) 45 μ l
- TEMED (Bio-Rad) 37 μ l

4.4.10.- Gel concentrador

- Solución acrilamida/ Bis acrilamida.
(Ver apdo. 4.4.1 de Mat. y Mét.) 0.75 ml
- Agua destilada 3 ml
- Solución concentradora
(Ver apdo. 4.4.4 de Mat. y Mét.) 1.25 ml
- Solución amonio persulfato
(Ver apdo. 4.4.3 de Mat. y Mét.) 15 μ l
- TEMED 5 μ l

4.5.- TECNICA ELISA

4.5.2.- Soluciones

4.5.2.1.- Soluciones salinas

4.5.2.1.1.- Tabletas PBS (SIGMA S.A.)

Composición por tableta:

- Cloruro potásico 0.0027 M
- Cloruro sódico 0.137 M

Disolver una pastilla de PBS en 200 ml de agua químicamente pura, llevar su pH hasta 7.4. Este PBS se utiliza en la técnica ELISA con antígeno A60, como bloqueante, lavador y diluyente.

Mantener refrigerado a 4°C. En el momento de usarlo ha de estar a temperatura ambiente. Desechar cuando se observe turbidez.

4.5.2.1.2.- PBS lavador

- Disolver una pastilla de PBS (SIGMA) en 1000 ml de agua destilada químicamente pura, llevar su pH hasta 7.4. Añadir 0.1 % Tween20 (Merck).

PBS utilizado como lavador en la técnica ELISA con antígeno MPB70.

Mantener refrigerado a 4°C. En el momento de usarlo ha de estar a temperatura ambiente.

4.5.2.1.3.- PBS fijador de antígeno

- Disolver una pastilla de PBS (SIGMA) en 1000 ml de agua destilada químicamente pura, llevar su pH hasta 7.4. Añadir 0.02 g de NaN₃ (azida sódica de laboratorios Merck).

PBS empleado como unidor del antígeno en la técnica ELISA con antígeno MPB70.

Mantener refrigerado a 4°C. En el momento de usarlo ha de estar a temperatura ambiente.

4.5.2.1.4.- PBS para bloqueo y diluciones

- Disolver una pastilla de PBS (SIGMA) en 1000 ml de agua destilada químicamente pura, llevar su pH hasta 7.4. Añadir 0.2 % Tween 20 y 0.05 % de albúmina sérica bovina (SIGMA).

PBS aplicado como PBS bloqueador y diluyente en la técnica ELISA con antígeno MPB70.

Mantener refrigerado a 4°C. En el momento de usarlo ha de estar a temperatura ambiente.

4.5.2.2.- Solución sustrato

4.5.2.2.1.- Para el antígeno MPB70

Solución A: Acido cítrico 0.1 M

- Acido cítrico 21.01 g
- Agua químicamente pura . 1000 ml

Solución B: Ortofosfato disódico 0.2 M, pH 5

- Fosfato disódico 28.39 g
- Agua químicamente pura . 1000 ml

Mezclar:

- Solución A 24.3 ml
- Solución B 25.7 ml
- Agua químicamente pura . . . 50 ml
- Ortofenildiamina 0.8 mg
- Agua oxigenada al 30 % . 0.08 ml

Momentos antes de utilizar el sustrato es cuando se debe añadir el agua oxigenada al 30 %

Esta solución no puede ser conservada, debido a la degradación del sustrato.

4.5.2.2.2.- Para el antígeno A60

Se utiliza la solución del apdo. 4.5.2.2 de Material y Métodos. Varía en cuanto a la concentración de agua oxigenada que será de 0.02 ml en lugar de 0.08 ml.

4.5.2.3.- Solución de parada

4.5.2.3.1.- Para el antígeno MPB70

- Acido sulfúrico 133 ml
- Agua químicamente pura . . 867 ml

4.5.2.3.2.- Para el antígeno A60 difiere del anterior en que la concentración del ácido sulfúrico fue 4 N.

*****Todas las soluciones han de ser preparadas con agua (químicamente pura).**

RESULTADOS

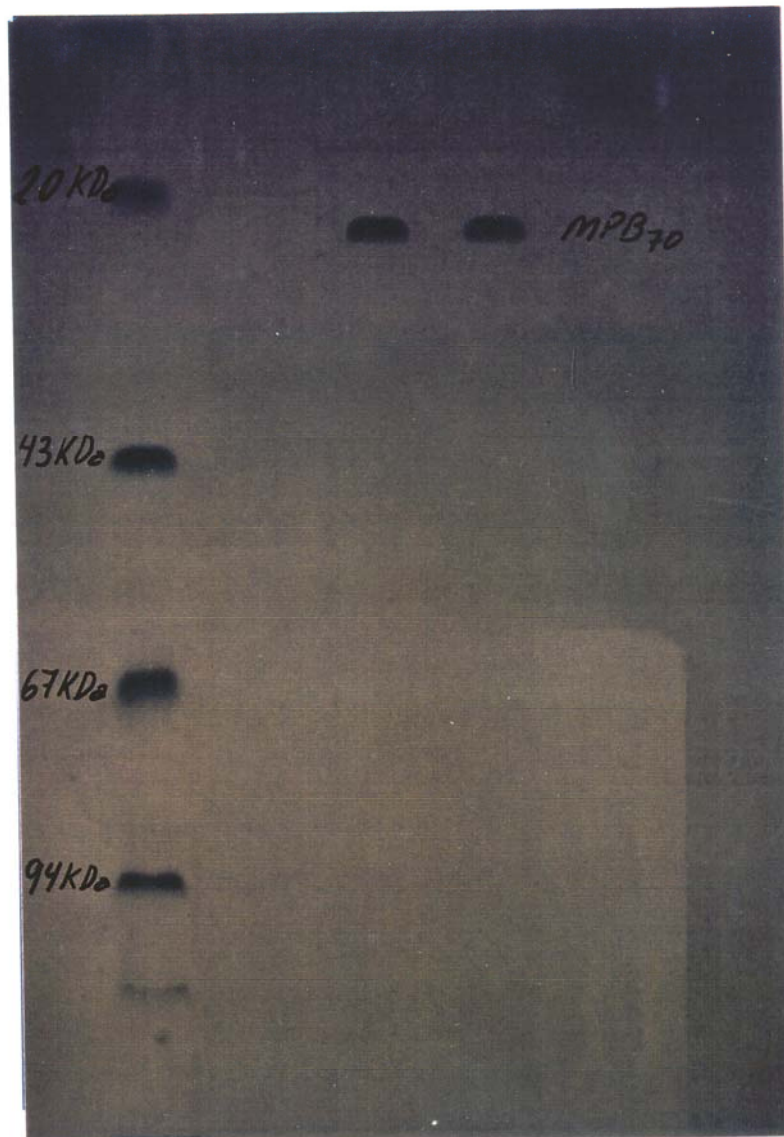
1.- RESULTADOS PRELIMINARES

1.1- CONTROL DE PUREZA DEL ANTÍGENO MPB70 EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)

Previo a la utilización del antígeno MPB70 en los análisis serológicos, consideramos oportuno controlar su nivel de pureza, con el fin de garantizar unos resultados más exactos y fiables del citado antígeno. Para comprobar su pureza hemos realizado una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Obtuvimos una proteína pura, compuesta por una sola banda, tal como se observa en la Figura XXXV. En la que nuestra proteína MPB70 se encuentra al lado de un patrón de pesos moleculares, una vez que ambas corrieron en un gel de poliacrilamida.

FIGURA XXXV. Electroforesis en gel de poliacrilamida



En el densitómetro de Pharmacia (Fast-system) conectado a una impresora obtuvimos dos gráfico enfrentados (tal como muestra la FIGURA XXXVI que se encuentra reducida al 24.05% del original).

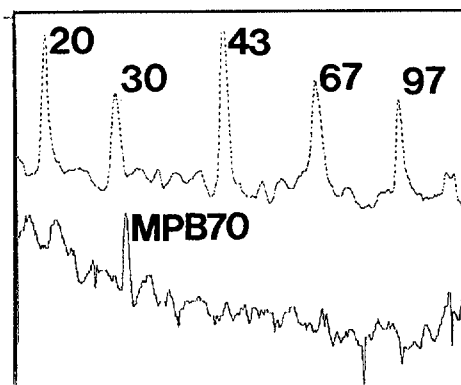


FIGURA XXXVI. Representación gráfica del análisis densitométrico del gel de poliacrilamida en el que se realizó la migración de proteínas.

La Figura XXXVI muestra los picos correspondientes a cada una de las proteínas del patrón proteico y un gráfico inferior en el que se muestra el pico de nuestra proteína MPB70.

Calculamos el índice de retención (R_f , apdo 3.3.1. de Material y Métodos) de cada uno de las proteínas componentes del patrón de pesos moleculares.

El valor de D_t (Apdo 3.3.1. de Material y Métodos) fue de 22 cm

Los valores de D_x (Apdo 3.3.1. de Material y Métodos) fueron los siguientes:

$D_{x1} = 0,8$ cm.... Corresponde a la proteína del patrón proteico con peso 97kDa

$D_{x2} = 3,5$ cm.... Corresponde a la proteína del patrón proteico con peso 67kDa

$D_{x3} = 7,8$ cm.... Corresponde a la proteína del patrón proteico con peso 43kDa

$D_{x4} = 12,6$ cm... Corresponde a la proteína del patrón proteico con peso 30kDa

$D_{x5} = 18,2$ cm... Corresponde a la proteína del patrón proteico con peso 20kDa.

El Dx de la proteína de 14kDa del patrón proteico no se tuvo que calcular pues el pico de nuestra proteína MPB70 quedó situado entre la proteína de 20 y la de 30kDa.

Finalmente calculamos el Dx del MPB70 que fue de 17,7 cm

A continuación calculamos los correspondientes Rf. para el patrón de pesos moleculares.

$$Rf = \frac{Dx}{Dt}$$

$$Rf_1 = 0.036, Rf_2 = 0.15, Rf_3 = 0.35, Rf_4 = 0.57, Rf_5 = 0.82$$

El Rf obtenido para la proteína MPB70 fue el siguiente $Rf_c = 0.80$.

El peso molecular de la proteína fue determinado gráficamente. Tal como muestra la Figura XXXVII, en el cual se observa la representación de una recta.

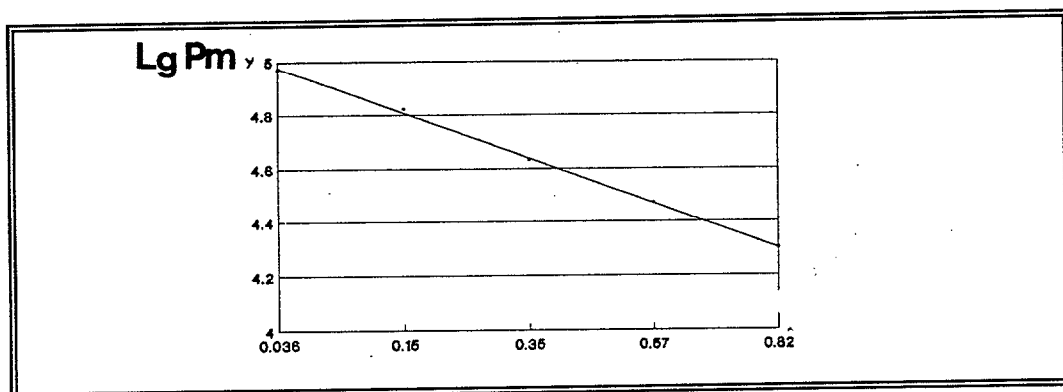


FIGURA XXXVII. Recta de calibrado obtenida mediante el programa TBcurve.

Con una varianza de 0,993 y una desviación típica de 0,997, y considerando un intervalo de confianza del 99 p.100 y un error del 0,1 p. 100, y aplicando la fórmula de la ecuación de una recta obtuvimos el peso molecular de nuestro antígeno MPB70.

$$Y = ax + b$$

$$Lg Pm = 0.80 \cdot Rf + 4.96$$

Lg Pm = 4,2896

Pm MPB70 = 19780,5 Da., resultado muy próximo al obtenido por M. HARBOE y cols (1990) que fue de 18000 Da mediante electroforesis.

Como consideración la proteína MPB70 enviada por el Dr Sadamu Nagai es de alta pureza, constado de una sola banda proteica.

1.2.- ESTANDARIZACION DEL METODO ELISA INDIRECTO CON ANTÍGENO MPB70

Como se describe en el apdo 3.3.2 de Material y Métodos para la optimización de la técnica hemos utilizado un suero de referencia positivo y otro negativo (SPF). De los sueros controles positivos se escogió aquel de un animal que hubiera dado menor lectura a la intradermorreacción tuberculínica. Procedimos a investigar sus niveles de IgG anti-*M. bovis* a fin de obtener un patrón positivo y negativo que nos sirviera de referencia en todos los análisis que realizaríamos con este método.

Determinamos la absorbancia a 405nm. que fue la utilizada por M. HARBOE y cols (1990) para ganado bovino.

Tal como reflejan las Figuras (I a la X), determinamos la concentración de antígeno óptima, así como la dilución ideal de suero y la calibración del conjugado.

Pudimos así observar que, con las distintas concentraciones de antígeno enfrentadas a las mismas diluciones de suero y conjugado, se obtenía mayor absorbancia cuando utilizamos la concentración de antígeno mayor. No obstante, también se puso de manifiesto que las absorbancias obtenidas con la concentración de antígeno menor mantenía las diferencias necesarias entre el control positivo y negativo como para poder utilizar dicha concentración (0.5 µg/pocillo), concentración que nos permitía un ahorro de antígeno MPB70 en el desarrollo de la experiencia.

Tal como se puede apreciar en la Figura II, las cantidades optimizadas han sido: 0.5 µg/pocillo de antígeno MPB70, dilución de suero al 1:50 y dilución del conjugado 1:3000.

El cálculo del punto de corte para caprino con el antígeno MPB70, se realizó enfrentado un suero libre de patógenos específicos al ELISA anteriormente descrito, obteniéndose una negatividad de 0,0045 de D O y marcándose el punto de corte en el doble de dicha media (0,009) (SANCHEZ Y CAMBRA, 1987).

Cada vez que se utilizó un nuevo lote de conjugado se volvió a realizar la calibración del mismo obteniéndose siempre 1/3000 como dilución óptima.

1.3.- ESTANDARIZACION DEL CONJUGADO PARA EL ELISA INDIRECTO CON ANTÍGENO A60

Ya sabíamos la dilución óptima de suero a utilizar y las placas las sirve Biosell antigenadas con una concentración de 0.6 μg hemos creído conveniente probar concentraciones intermedias de conjugado a las indicadas por Biosell por si alguna de ellas diera mejores resultados, ya que no trabajamos con los reactivos vendidos por la misma casa comercial sino que fueron utilizados por nosotros de otras casas comerciales tal como queda descrito en el apartado 4.5 de Material y Métodos.

Se probaron diluciones de conjugado de 1/4000, 1/5000 y 1/6000, observándose que los mejores resultados se obtenían a la dilución 1/4000, como se aprecia en la Figura XI.

Tal como habíamos establecido la dilución de suero utilizada fue al 1/50 y la concentración de antígeno 0.6 μg /pocillo.

Con las condiciones anteriormente descritas se realizó un ELISA con un suero libre de patógenos específicos (como control negativo) y un control positivo de ganado caprino a la infección por *M.bovis* diagnosticado por intradermorreacción, microbiología y ELISA indirecto con antígeno MPB70. Se observó una D O del control negativo igual a 0,198, marcando un punto de corte de 0,396 D O.

2.- RESPUESTA DEL GANADO CAPRINO EXENTO DE INFECCION POR *M. bovis*

Previo a su selección, confirmamos que los animales no estaban presuntamente infectados por *M. bovis* ni *M. avium subsp. paratuberculosis*, a tal efecto se les realizó una intradermorreacción comparada con PPD bovina y PPD aviar y un inmunoanálisis con la técnica ELISA indirecta con antígeno MPB70. Las dos pruebas resultaron negativas.

Los valores representados en las Figuras de la XII a la XXIX son el resultado de calcular en los tres animales de cada lote la media de sus respuestas en cada una de las experiencias del trabajo.

2.1.- A DISTINTAS PAUTAS DE INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA REPETIDA

Los resultados obtenidos de las pruebas de tuberculinización repetida que se realizó según la Tabla III son los siguientes representados en las Tablas VI y VII, a partir de los cuales se ha obtenido la media para cada lote:

LOTE TESTIGO.- Con el fin de disminuir la variabilidad individual que pudieran presentar las mediciones del grosor de la piel en la Agrupación Caprina Canaria, a las cabras de este lote se les realizó una medición del grosor de la piel del lado derecho (Tabla VI, Figura XII) e izquierdo (Tabla VII, Figura XIII) de la región del cuello de forma repetida con intervalos de dos semanas. Hemos observado que las fluctuaciones de dicho grosor iban de 0.2 cm a 0.4 cm, dando una variabilidad normal en el grosor de la piel de $0.3 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$.

LOTE I.- En la intradermorreacción con PPD bovina tal como se observa en la Tabla VI y Figura XXVII se produce un aumento paulatino del grosor de la piel tras la primera y segunda inoculación, un ligero descenso tras la tercera y la cuarta, para tras la quinta y sexta tuberculinización volver a observarse ligeros aumentos.

Cuando la intradermorreacción era realizada con PPD aviar, se

observaron ligeros descensos tras la 1^a, 2^a, 3^a y cuarta inoculación para después observarse un ligero aumento tras la quinta y sexta tuberculinización (Tabla VII y Figura XXVIII).

Sin embargo en ninguno de los dos casos la medición del grosor de la piel 48 h después de la tuberculinización mostró diferencias significativas con respecto a la realizada antes de la misma, no observándose por lo tanto durante el desarrollo de la experiencia la aparición de individuos positivos debido a la realización repetida de dicha prueba.

LOTE II.- Obtenemos un aumento del grosor de la piel tras la inoculación tanto de la PPD bovina como de la aviar que aumenta ligeramente después de la primera inoculación (Tablas VI y VII, Figuras XXIV y XXV) para decaer tras la segunda dosis. Y en el período de intertuberculinización entre la segunda dosis y la tercera en el caso de la PPD bovina seguir descendiendo suavemente para volver a elevarse tras la tercera tuberculinización. En la PPD aviar entre la segunda dosis y la tercera se detecta un ligero aumento para volver a decaer ligeramente tras la tercera tuberculinización.

El aumento de grosor de la piel que se produce en este lote a lo largo de la experiencia no refleja en ningún caso indicios de positividad.

LOTE III.- La intradermorreacción comparada muestra unos resultados que se mantienen dentro del rango de la negatividad (Tablas VI y VII, Figuras XXI y XXII), y de forma similar a como se produjeron en lotes anteriores.

LOTE IV.- Las Figuras XVIII y XIX correspondientes al estudio de la hipersensibilidad retardada demuestran un ligero aumento tras la primera inoculación con ambas tuberculinas manteniéndose luego para volver a aumentar ligeramente tras la segunda tuberculinización en el caso de la PPD bovina (Tabla VI) y, en el caso de la PPD aviar (Tabla VII), producirse un aumento apreciable tras la primera inoculación y mantenerse tras la segunda inoculación en los mismos valores que antes de tuberculinizar, valores que en ningún caso indican la existencia de positividad.

LOTE V.- En el estudio con la PPD bovina (Tabla VI y Figura XV), se observa como tras cada tuberculinización existe un ligero aumento del grosor de la piel pero que se mantiene dentro de los valores normales. Los mismos resultados pudimos observar con la

PPD aviar (Tabla VII y Figura XVI).

LOTE VI.- La media de grosor de la piel antes de tuberculinizar con ambas tuberculinas fue de 0.23 cm y la lectura de la prueba a las 48 h se produce un ligero aumento quedando su valor en 0.3 cm (Tablas VI y VII).

2.2.- A LA TECNICA ELISA INDIRECTA CON ANTIGENO MPB70

LOTE TESTIGO.- Se realizó un estudio serológico mediante la técnica ELISA con antígeno MPB70 observándose la existencia de una variabilidad normal en la densidad óptica de 0.0015 ± 0.0045 (Figura XIV), en este grupo de animales considerados exentos de la infección por *M. bovis* (Tabla VIII).

LOTE I.- Los resultados obtenidos indican la aparición de positividad tras las sucesivas tuberculinizaciones en dos animales de este lote. Dato que no se observó al principio de la experiencia (Lote 6 Tabla VIII y Figura XXIX). Los resultados obtenidos son los siguientes: en el primer día de la experiencia, antes de la intradermorreacción, la D O estaba en 0.003 y 48 h después de la misma 0.0006. La siguiente tuberculinización es realizada a la segunda semana de la primera y la D O: antes fue 0.0016 y posteriormente de 0.0043. En la tuberculinización realizada a la cuarta semana de la primera, obtuvimos las siguientes D O antes 0.0036 después 0.006. La tercera intradermorreacción fue realizada a la sexta semana de la primera observándose antes de realizar la misma una D O de 0.0006 y después de la misma asciende a 0.0056. Una cuarta intradermorreacción fue realizada a la octava semana de la primera, los datos de D O antes y después fueron los siguientes: 0.0073 y 0.005 respectivamente. A la décima semana de la primera se realizó la última prueba resultando de antes de la misma una D O de 0.006 y 48 horas después de 0.009 (Tabla VIII).

LOTE II.- La respuesta humoral evidenciada con antígeno MPB70 muestra un descenso tras cada tuberculinización, observándose en los periodos de intertuberculinización un aumento de la densidad óptica pero que siempre se mantiene dentro de los límites de los valores negativos (Tabla VIII y Figura XXVI).

Antes de la primera tuberculinización la D O a MPB70 es

0.001, y 48 h después -0.001. La segunda inoculación de tuberculina se realiza a cuatro semanas de la primera, observándose antes de la misma una D O de 0.0016 y 48 h después -0.001. La tercera tuberculinización tiene lugar a la octava semana de la primera, antes de la misma la D O a MPB70 es de 0.0056 después 0.004. En ningún caso, por tanto, se aprecia algún valor positivo en este lote.

LOTE III.- Los anticuerpos frente a la proteína MPB70 muestran igual respuesta que en la intradermorreacción, aunque se produce un aumento de la misma tras la segunda tuberculinización. Los niveles se mantienen dentro de los valores obtenidos en nuestro lote control. En el primer día de la experiencia antes de la intradermorreacción la D O es de 0.001 y 48 h después 0.0026. Tras la segunda prueba realizada a la sexta semana de la primera se observa antes D O de 0.003 y 48 h después 0.004 (Tabla VIII y Figura XXIII).

LOTE IV.- Observamos una caída de la respuesta humoral anti-MPB70 tras cada tuberculinización pero que se mantiene dentro de los valores normales según nuestro lote control (Figura XX). Antes de la primera tuberculinización muestra una D O de 0.004 y 48 h después de la misma desciende a -0.001. La segunda inoculación es realizada a las 10 semanas de la primera siendo antes de tuberculinizar la D O es de 0.002 después desciende a 0.001 (Tabla VIII).

LOTE V.- En este lote observamos como tras la primera tuberculinización el nivel de IgG anti-MPB70 se mantiene al mismo nivel que antes de tuberculinizar (D O de 0.004), mientras que posteriormente asciende ligeramente (0.007) pero sin llegar al punto de corte situado en 0,009 de densidad óptica, para descender tras la segunda tuberculinización nuevamente (0.005) (Tabla VIII y Figura XVII).

LOTE VI.- Antes de tuberculinizar el nivel de anti-MPB70 quedó en 0.0023 y a las 48 h 0.001. No se produce la aparición de resultado positivo en ningún caso (Tabla VIII).

Comoquiera que entre las lecturas de la experiencia de intradermorreacción tuberculínica y la estandarización y aplicación del ELISA con antígeno MPB70 de los sueros de estos animales debió transcurrir algún tiempo, los dos animales que dieron positivos a la técnica ELISA en este último lote solo pudo ser sacrificado uno de ellos ya que el otro había sido vendido por error.

Se sacrificó el animal del lote que mayor nivel de anticuerpos frente a MPB70 presentó, en busca de que el aumento de dicha densidad óptica fuera debido a una infección por micobacterias. Tras la eutanasia e inspección minuciosa de la canal, vísceras y ganglios no pudimos poner en evidencia ningún tipo de lesión macroscópica propia de una infección por *Mycobacterium spp*, únicamente un área de hemorragia subcutánea en el apdo de inoculación de la tuberculina.

3.- RESPUESTA EN CABRAS CON UNA PRESUNTA INFECCION NATURAL POR *M. bovis*

3.1.- Intradermorreacción tuberculínica

La medida media de grosor de la piel de este grupo (grupo 1 Tabla II) de animales antes de tuberculinizar fue de 3 mm y 48 h postinoculación con PPD bovina todos ellos sufrieron un aumento de grosor superior a 1,5 mm, oscilando entre 2 y 14 mm más que antes de tuberculinizar (Tablas IV y IX).

3.2.- Diagnóstico anatomopatológico

De estos animales positivos a la tuberculina fueron sacrificados dos de los mismos en el Matadero Municipal de Las Palmas de Gran Canaria, lugar en el que se procedió a una inspección rigurosa de la canal, vísceras y ganglios. Resultando la observación de nódulos caseosos localizados preferentemente a nivel de pulmón y ganglios traqueobronquiales (FIGURA XXXVIII)I. El animal caprino cuyo crotal correspondía al número 5885 presentó además una lesión caseosa en ganglio inguinal.

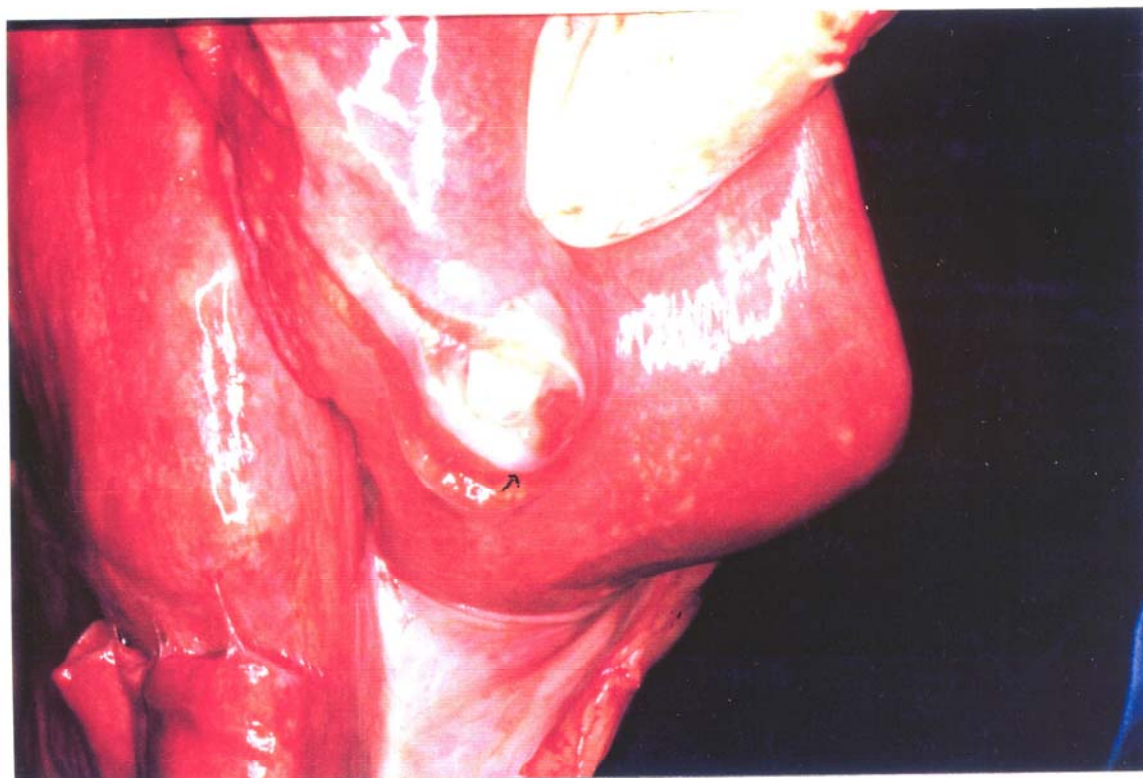


FIGURA XXXVIII.- Nódulo caseoso en pulmón de un caprino con infección por *M.bovis*

3.3.-Diagnóstico microbiológico

Aislamiento en medio de cultivo

En los dos animales sacrificados se obtuvo crecimiento en medio de Löwenstein con piruvato tras un mes y medio de incubación. Una semana más tarde se observó crecimiento en Löwenstein sin piruvato en ambos casos pero siempre con menor número de colonias. Del ganglio inguinal del caprino 5885 no hubo crecimiento

Mediante frotis y tinción de Zielh Neelsen del crecimiento se pusieron en evidencia bacilos alcohol ácidos resistentes (FIGURA XXXIX), tanto de pulmón como de ganglios bronquiales de ambos animales.

Las características culturales y bioquímicas (Tabla III) identificaron los aislados como *M.bovis* en ambos casos.

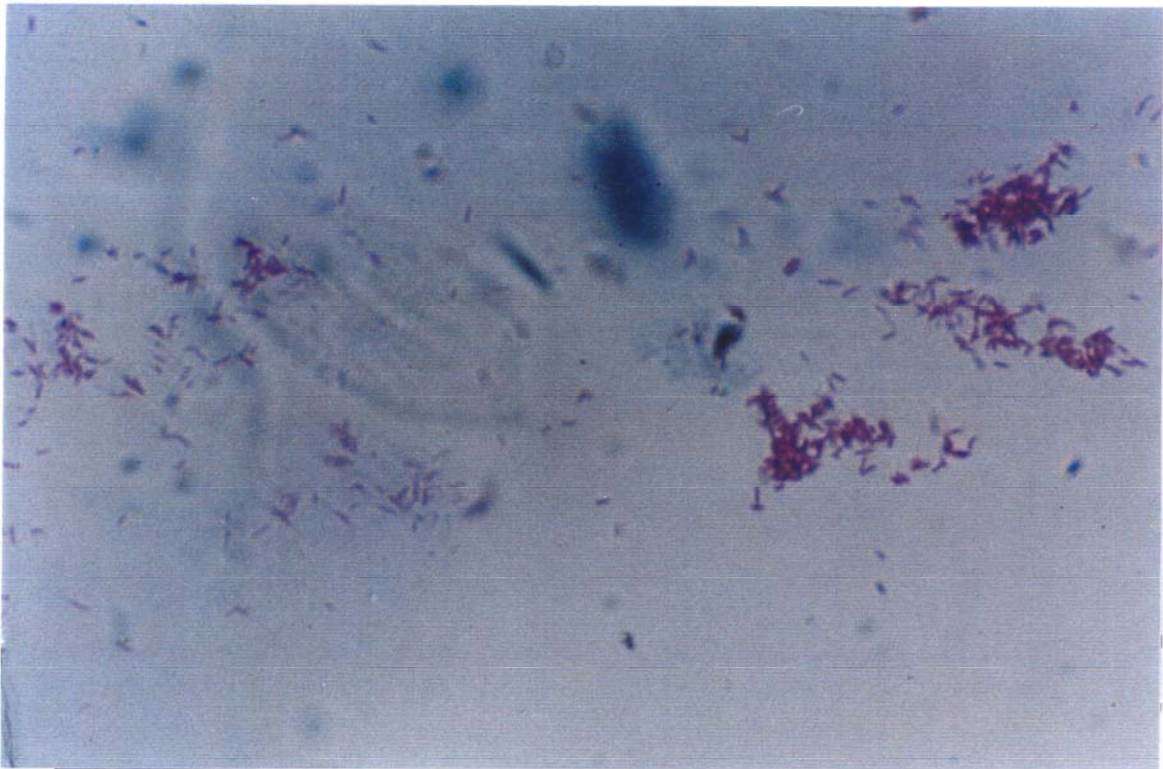


FIGURA XXXIX.- Tinción de Zielh Neelsen de *M.bovis* a 1000 aumentos

3.4.-Respuesta humoral frente a los antígeno MPB70 y A60 la técnica ELISA

Después de obtener los 32 animales positivos a la tuberculina con PPD bovino, y tras haberse comprobado la infección por *M.bovis* en dos de ellos, se sometieron los 32 sueros a la técnica ELISA con antígenos MPB70 y A60.

Frente al antígeno MPB70 se mostraron todos ellos altamente positivos (Tabla IX, Figura XXX), alcanzándose densidades ópticas entre 0.009 del animal 7 y los 0.224 del animal 28 (Tabla IX). Teniendo en cuenta que el punto de corte para el antígeno MPB70 en caprino lo hemos fijado en una densidad óptica de 0.009.

Cuando utilizamos el antígeno A60 obtenemos trece animales negativos y 19 positivos. El punto de corte frente a este antígeno del suero caprino testigo positivo estaba fijado en una densidad óptica de 0.396. Los rangos de positividad de estos 19 animales

oscilaron entre densidades ópticas de 0.398 y 0.553 (Tabla IX).

4.-RESPUESTA DEL LOTE DE CABRAS CON UNA INFECCION NATURAL POR *C. pseudotuberculosis* EN ESTADO ACTIVO Y EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*

4.1.- ESTABLECIMIENTO DEL ESTADO DE EXENCION DE LA INFECCIÓN POR *M.bovis*

Todos los animales seleccionados presentaron antes de la intradermorreacción una media de grosor de la piel de 3 mm y tras la tuberculinización comparada con PPD bovina y aviar no se observó ningún indicio de positividad. Campañas contra la tuberculosis realizadas en años anteriores por la Consejería de Agricultura del Gobierno de Canarias no revelaron nunca un caso positivo a dicha enfermedad en esta explotación.

4.2.-HALLAZGOS CLINICOS

Estos animales presentaron nódulos de consistencia blanda, localizados preferentemente en ganglio preescapular y/o retromamarios (Figura XXXIX) que se distribuían de la siguiente forma:

ANIMAL NUMERO	LOCALIZACION DE LA LESION
1	RETROMAMARIA UNILATERAL
2	RETROMAMARIA UNILATERAL
3	PREESCAPULAR UNILATERAL
4	RETROMAMARIA UNILATERAL
5	PREESCAPULAR UNILATERAL

No observándose ningún otro signo o síntoma clínico.



FIGURA XXXIX.- Lesión en ganglio retromamario de una cabra enferma de pseudotuberculosis.

4.2.1.-Resultados a la intradermorreacción tuberculínica durante la experiencia

Todos los animales seleccionados antes de la intradermorreacción presentaron una media de grosor de la piel de 3 mm. Tras la tuberculinización comparada con PPD bovina y aviar no se observó ningún indicio de positividad. Las sucesivas lecturas de las pruebas alérgicas quedan plasmadas en la Tablas X y XI y Figuras XXXI y XXXII. La primera de ellas corresponde al grosor de la piel antes de tuberculinizar (día cero) de los cinco animales del grupo, el resto de los datos pertenecen a las lecturas de las sucesivas intradermorreacciones (1^{era}, 2^{da}, 3^{era} y 4^{ta} tuberculinización) realizadas los días 1,7,14 y 28 de la experiencia y leídas los días 3, 9, 16 y 30, respectivamente.

4.2.2.-Resultados microbiológicos

Al finalizar la experiencia de tuberculinización, la constatación de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en este grupo de animales se realizó mediante cultivo en agar sangre del exudado caseoso obtenido por incisión de los nódulos bajo condiciones de asepsia, desinfección y anestesia local previa de la zona. Se observó el crecimiento de colonias de menos de 1 mm de diámetro a las 48 h de incubación con bordes bien definidos. Obteniéndose un cultivo puro en los cinco animales.

4.2.2.1.-Bacterioscopia y pruebas bioquímicas y complementarias

Tras bacterioscopia del crecimiento de las colonias y con la técnica de tinción Gram, observamos cocobacilos gram positivos.

Todas las cepas aisladas de los cinco animales de este lote resultaron positivas a la prueba de la hemólisis sinérgica en una placa de agar sangre enfrentadas a *Rhodococcus equi* (cepa 555) al igual que resultó positiva la prueba de la inhibición de la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, enfrentadas en una placa de agar sangre.

Todas las cepas aisladas mostraron similares características culturales y bioquímicas (FIGURA XXXX), identificativas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

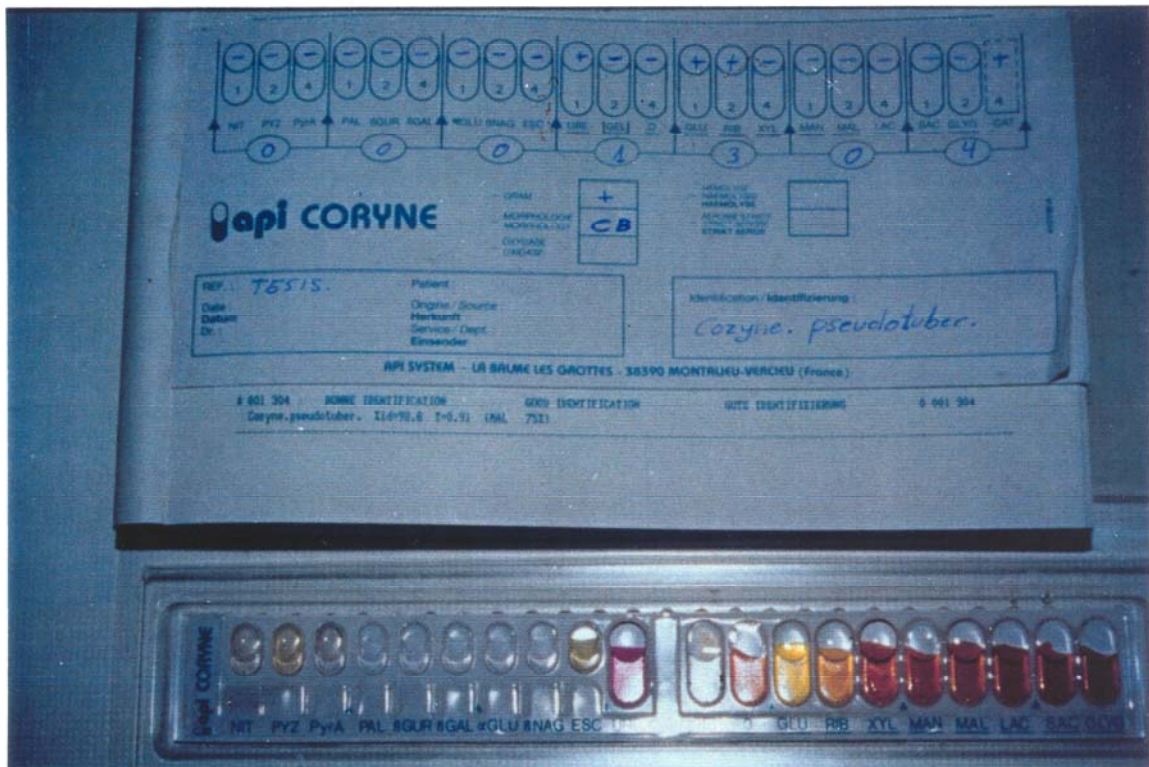


FIGURA XXXX.- Identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante el uso de galería API CORYNE

4.3.-RESPUESTA HUMORAL A LA TECNICA ELISA CON LOS ANTÍGENOS MPB70 Y A60 DURANTE SUCEASIVAS INOCULACIONES CON TUBERCULINA BOVINA Y AVIAR

El punto de corte de la técnica ELISA con antígeno MPB70 quedó establecido tras estandarización de la técnica en una D O de 0.009. En la experiencia las cabras de este grupo (Tabla XII, Figura XXXIII) que habían sido tuberculinizadas cuatro veces con PPD bovina y aviar, una cabra (cabra nº 3) siempre resultó negativa en la técnica ELISA con antígeno MPB70. No así el resto, que seroconvirtieron a positivas después de la tercera tuberculinización. Obtuvimos unas densidades ópticas de 0.001, 0.014 y 0.018 para los animales 1, 2 y 4, respectivamente. Tras la cuarta tuberculinización intradérmica todas las densidades ópticas volvieron a ser negativas, excepto el animal número 4, que aumentó la reacción frente al antígeno MPB70 dando una D O de 0.023. Todos los animales resultaron negativos antes de ser tuberculinizados.

El punto de corte al antígeno A60 en la técnica ELISA quedó establecido en 0.396.

Con este método dos (nº 3 y 4) de los cuatro animales dieron un resultado positivo (0.434 y 0.4263, respectivamente) con antígeno A60 antes de ser sometidos a la tuberculinización intradérmica. Tras la primera intradermorreacción ambos seroconvirtieron a negativos. La cabra 3 tras la tercera tuberculinización muestra una D O de 0.434 para volver a ser negativa después de la cuarta prueba alérgica. Llama la atención la respuesta del animal número 4 con D O superiores al punto de corte antes de ser tuberculinizado. Después de la segunda y de la tercera tuberculinización, las D O de este animal sufrieron un ascenso a la positividad para volver a seronegativo tras la cuarta tuberculinización (Tabla XIII, Figura XXXIV).

La cabra 2 inicialmente negativa, también desarrollo una respuesta sinusoidal (0.344, 0.338, 0.434, 0.313) con final seronegativo.

En cuanto a la cabra 1 únicamente mostró seroconversión positiva (0.414) tras la primera tuberculinización. Los resultados de estos animales quedan reflejados en la Tabla XIII y Figura XXXIV.

Debido a que el animal número cuatro se mostró positivo en distintos momentos para ambos antígenos (MPB70 y A60) fue sacrificado en busca de una posible tuberculosis, aunque en ningún momento mostrara reacción de hipersensibilidad a la tuberculina bovina o aviar. Tras inspección minuciosa de la canal, vísceras y ganglios no se pudo poner de manifiesto lesión alguna que no fueran la propias de pseudotuberculosis. La siembra de dichas lesiones en medios para micobacterias (Löwenstein Jensen con y sin piruvato) no obtuvieron crecimiento alguno.

5-RESPUESTA HUMORAL A LA TECNICA ELISA CON LOS ANTÍGENOS MPB70 Y A60 EN CABRAS INFECTADAS POR *Mycobacterium avium subesp.*

Esta fase del trabajo la desarrollamos con los 15 animales infectados de forma natural descritos en el apdo 2.1 de Material y

Métodos.

Los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA con antígeno MPB70 no revelaron ningún animal positivo. Las densidades ópticas oscilaron entre -0.004 y 0.008. El punto de corte estaba en 0.009 (Tabla XIV, Figura XXXV).

La técnica ELISA con antígeno A60 reveló un resultado de 13 animales positivos, que mostraron densidades ópticas entre 0.396 y 0.489 (Tabla VIII, Figura XXXV). El punto de corte para este antígeno en la especie caprina es de 0.396 y sólo tres animales mostraron densidades ópticas inferiores.

6.- RESULTADOS DEL ESTIMADOR KAPPA

A continuación resumimos los animales diagnosticados por las diferentes técnicas anteriores es la siguiente:

De 32 caprinos infectados de forma natural por *M.bovis*:

- 2 caprinos comprobados microbiológicamente**
- 32 positivos a la intradermorreacción con PPD bovina**
- 32 positivos con antígeno MPB70**
- 19 positivos con antígeno A60**
- 13 negativos con antígeno A60**

De 15 caprinos infectados de forma natural por *M.avium subsp.paratuberculosis*:

- 15 caprinos comprobados por inmunodifusión en gel de agar**
- 15 negativos a la intradermorreacción con PPD bovina**
- 15 negativos con antígeno MPB70**
- 13 positivos con antígeno A60**
- 2 negativos con antígeno A60**
- 1 positivo microbiológicamente**

De 5 caprinos infectados de forma natural por *C.pseudotuberculosis*:

- 5 caprinos positivos microbiológicamente
- 5 negativos a la intradermorreacción con PPD bovina
- 5 negativos con MPB70
- 2 positivos con A60
- 3 negativos con A60

6.1.-RESULTADOS DE KAPPA TOMANDO COMO TECNICA ESTANDAR LA INTRADERMORREACCIÓN TUBERCULINICA CON PPD BOVINO PARA COMPARAR LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA POR *M.bovis*.

Intradermorreacción con PPD bovina			
	+	-	TOTAL
ELISA + (MPB70)	32	0	32
-	0	20	0
TOTAL	32	20	52

Prevalencia aparente intradermorreacción = 0.615

Prevalencia aparente MPB70 = 0.615

Probabilidad de común acuerdo real = $(32 + 20)/52 = 1$

Probabilidad de común acuerdo de (+) = $0.615 \times 0.615 = 0.378$

Probabilidad de común acuerdo de (-) = $0.384 \times 0.384 = 0.147$

Probabilidad de común acuerdo debida al azar = $0.378 + 0.147 = 0.525$

Mínima probabilidad de común acuerdo = $1 - 0.525 = 0.474$

Máxima probabilidad de común acuerdo = $1 - 0.525 = 0.474$

KAPPA = $0.474/0.474 = 1$

El estimador Kappa toma valor 1, de lo que resulta una coincidencia real total entre la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina y el ELISA indirecto con antígeno MPB70 en el diagnóstico de la tuberculosis caprina debida a *M.bovis*.

6.2.-RESULTADOS DE KAPPA TOMANDO COMO TECNICA ESTANDAR LA INTRADERMORREACCION TUBERCULINICA CON PPD BOVINO PARA COMPARARLA TECNICA ELISA CON ANTIGENO A60 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA POR *M.bovis*.

		Intradermorreacción con PPD bovina		
		+	-	TOTAL
ELISA (A60)	+	19	15	34
	-	13	5	18
TOTAL		32	20	52

Prevalencia aparente intradermorreacción = 0.653

Prevalencia aparente A60 = 0.615

Probabilidad de común acuerdo real = (19 + 5)/52 = 0.461

Probabilidad de común acuerdo de (+) = 0.615x0.653 = 0.401

Probabilidad de común acuerdo de (-) = 0.384x0.346 = 0.132

Probabilidad de común acuerdo debida al azar = 0.401 + 0.132 = 0.533

Mínima probabilidad de común acuerdo = 0.461-0.533 = -0.072

Máxima probabilidad de común acuerdo = 1-0.533 = 0.467

KAPPA = -0.072/0.467 = -0.154

El estimador Kappa toma valor (-), de lo que resulta que la coincidencia entre positivos y negativos obtenidos por cada una de las técnicas se debe al azar, resultando además pruebas totalmente discordantes.

6.3.-RESULTADOS DE KAPPA TOMANDO COMO TECNICA ESTANDAR EL ELISA INDIRECTO CON MPB70 PARA COMPARARLA TECNICA ELISA CON ANTÍGENO A60 EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS POR *M.bovis*.

		ELISA (MPB70)		TOTAL
		+	-	
ELISA (A60)	+	19	15	34
	-	13	5	18
TOTAL		32	20	52

Prevalencia aparente intradermorreacción = 0.653

Prevalencia aparente A60 = 0.615

Probabilidad de común acuerdo real = (19 + 5)/52 = 0.461

Probabilidad de común acuerdo de (+) = 0.615x0.653 = 0.401

Probabilidad de común acuerdo de (-) = 0.384x0.346 = 0.132

Probabilidad de común acuerdo debida al azar = 0.401 + 0.132 = 0.533

Mínima probabilidad de común acuerdo = 0.461 - 0.533 = -0.072

Máxima probabilidad de común acuerdo = 1 - 0.533 = 0.467

KAPPA = -0.072/0.467 = -0.154

El estimador Kappa toma valor (-), de lo que resulta que la coincidencia entre positivos y negativos obtenidos por cada una de las técnicas se debe al azar, resultando además pruebas totalmente discordantes.

7.-ESTUDIO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR *M. bovis* MEDIANTE ELISA INDIRECTO CON ANTIGENO MPB70 EN LA POBLACION CAPRINA DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE

7.1.-ESTUDIO SEROLOGICO EN LA ISLA DE GRAN CANARIA

En la isla de Gran Canaria se muestrearon los siguientes municipios: Las Palmas, Telde, Ingenio, Sta. Lucía de Tirajana, San Bartolomé de Tirajana, Agaete, Galdar, Santa María de Guía, Teror y Santa Brígida.

En total se analizaron 56 explotaciones localizadas preferentemente en zonas costeras de la isla. El total de animales analizados fue 780 y se obtuvo un resultado de 29 explotaciones positivas (Tabla XV). Resultando un total de 64 animales positivos. Sus densidades ópticas oscilaron entre 0.009-0.074 (Tabla XVI).

Se obtiene una prevalencia del 8,2 p 100 de tuberculosis caprina en la isla de Gran Canaria que se distribuye por toda la costa excepto en los municipios de Ingenio y Guía. Se desconoce datos sobre los municipios de Arucas y Mogán que no pudieron ser muestreados y forman también parte de la costa isleña, tal como muestra el mapa (Figura XXXI) adjunto.



FIGURA XXXI.- Municipios de Gran Canaria. Los municipios rallados corresponden a aquellos en los que se ha detectado infección por *M. bovis*

7.2.-ESTUDIO SEROLOGICO EN LA ISLA DE LANZAROTE

Se muestrearon los municipios de Yaiza, Tías, San Bartolomé, Arrecife, Teguiise y Tinajo.

Se tomaron muestras de sangre de 570 cabras procedentes de 64 explotaciones. Resultaron seropositivas a la técnica ELISA con antígeno MPB70 44 caprinos. Resultando una prevalencia de para la isla de Lanzarote de 7.7 p 100 que se distribuye por toda la isla excepto por el municipio de Haría que no se muestreó (Tablas XVII y XVIII).

Las densidades ópticas oscilaron entre 0.009-0.107, tal como se observa en la Tabla XIII.

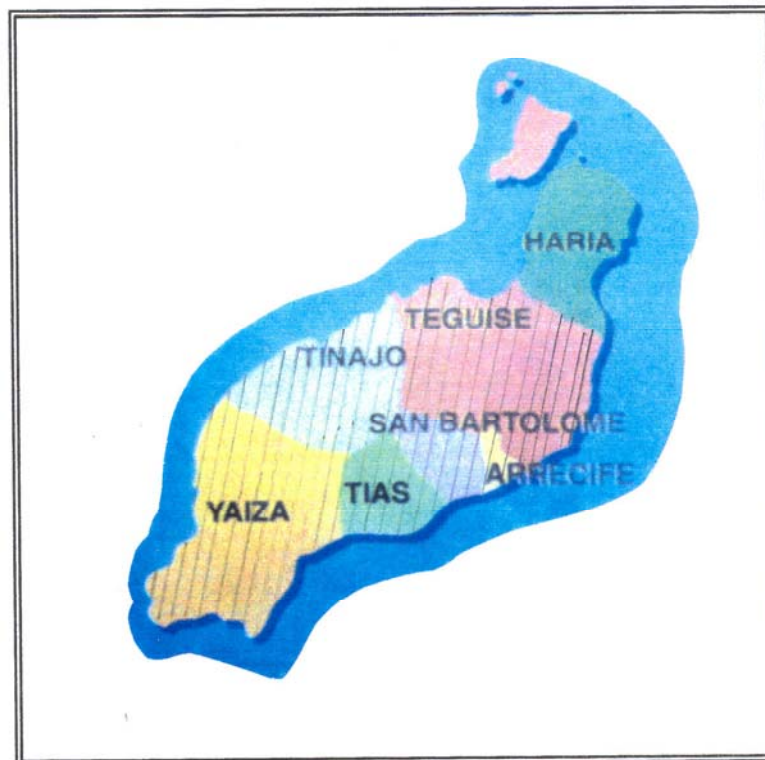


FIGURA XXXXII.- Municipios de Lanzarote. Los municipios rallados corresponden a aquellos en los que se ha detectado infección por *M. bovis*

DISCUSION

1.- UTILIDAD DE LOS ANTIGENOS MPB70 Y A60 EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA POR *M.bovis* UTILIZANDO LA TÉCNICA ELISA

1.1.- FRENTE AL EMPLEO DEL ANTIGENO MPB70

El gran problema del diagnóstico de la tuberculosis es debido a la existencia de antígenos comunes entre las diversas especies de micobacterias y de estas con otras especies de géneros cercanos taxonómicamente como nocardias y corinebacterias (WOLINSKY, 1978).

Si bien C. J. THORNS y MORRIS (1983) opinaban que la especificidad de los anticuerpos de los animales infectados por *M. bovis* era baja o no detectable mediante el uso de la técnica ELISA, estudios posteriores revelan lo contrario.

Muchos han sido los intentos realizados en busca de un antígeno que ofreciera al diagnóstico de la infección por *M.bovis* una alta sensibilidad y especificidad, y variadas han sido también las técnicas aplicadas a cada uno de los antígenos que se han purificado de esta y otras especies de micobacterias. Así el PPD ha sido aplicado a la técnica de intradermorreacción tuberculínica (SUTHER y cols., 1974; NAGAI y cols., 1991; NEILL y cols., 1992; ACOSTA y cols., 1993), ELISA (THOEN y cols., 1983; RITACCO y cols., 1990), γ -interferón bovino (ROTHEL y cols., 1990; WOOD y cols., 1992). Mediante la técnica inmunoenzimática ELISA se han usado: antígeno crudo y sonicado de *M.bovis* (AUER, 1987, AUER y SCHELEHANF, 1988), *M.bovis* tratado con deoxicolato sódico (HALL y cols., 1986), A60 (COCITO y VALINDEN, 1986; MCFADDEN y HOUDAYER, 1988; FADDDA y cols., 1992), fosfatidil inositol dimanósido (TEPLIZKI y cols., 1987), antígeno de 38 kDa de *M.tuberculosis* (ESPITIA y cols., 1989), BCG como antígeno (GARCIA-CARREÑO y cols., 1986), antígeno 5 (BALESTRINO y cols., 1988; RADHAKRISMAN y MATHAI, 1991), antígeno fenol-glicolípido (PGL-TB1) (CASABONA y cols., 1989), antígeno fosfatídico (HANNA y cols., 1989), antígenos glicolípidos (REGGIARDO y MIDDLEBROOK 1975), MPB70 (NAGAI y cols., 1981; FIFIS y cols., 1989; WOOD y cols., 1992; FLAMAND y cols., 1994).

J. HANNA y cols. (1989) opinan que existe especificidad en los anticuerpos de los animales infectados por *M.bovis* mediante la técnica ELISA y que realmente todo depende de la elección del antígeno adecuado.

De todos los antígenos mencionados es el MPB70 el que mejores resultados ha mostrado en los últimos años (FIFIS y cols., 1989) cuando la técnica diagnóstica empleada es el método ELISA, si bien con el método del γ -interferón bovino se están obteniendo también muy buenos resultados (WOOD y cols., 1992).

El MPB70 fue primeramente descrito por S. NAGAI y cols. (1981), como una proteína purificada de *M.bovis BCG subcepa Tokio*, carente de cisteína y de triptófano. Ha existido una gran controversia en cuanto al peso molecular de dicha proteína, S.NAGAI y cols. (1981) hablan de un peso molecular de 15 kDa mediante técnica de sedimentación y de 18 kDa mediante la técnica de la electroforesis (SDS-PAGE). No obstante, en una comunicación personal el mismo S. NAGAI modifica dicho peso a 22 kDa (NAGAI y cols. cit. ABOU-ZEID y cols., 1987), K. MIURA y cols. (1983) detectan también mediante electroforesis un peso molecular de 18 kDa. M. HARBOE y cols. (1984) obtienen para esta proteína por electroforesis un peso molecular de 22 kDa. C. ABOU-ZEID y cols. describen en 1987 una proteína dimérica de 46 kDa formada por dos subunidades de 23 kDa detectada en filtrados realizados a distintas cepas de *M.bovis BCG*. Ya S. NAGAI y cols. en 1981 observaron una proteína MPB70 que denominaron MPB70a, esta se diferenciaba de la anterior en que era ligeramente más ácida no observándose otra diferencia entre ellas, existiendo la posibilidad de que alguna sustancia de bajo Pm abandone a MPB70, sin mencionar la naturaleza de dicha sustancia. R.G. HEWINSON y RUSSELL (1993), mediante la secreción por *Escherichia coli* de una unidad recombinante de la proteína MPB70, observan dos unidades con distintas masas moleculares, una de 26 kDa y otra de 22 kDa. Nosotros tras electroforesis (SDS) realizada al MPB70 enviado por el Dr. SADAMU NAGAI hemos obtenido una sola banda proteica cuyo peso molecular se aproximó a los 18 kDa obtenidos en un principio por S. NAGAI y cols. (1981) y K. MIURA y cols. (1983). De estos resultados se desprende que parece evidente que hemos usado una proteína pura, empleada como antígeno en la técnica de ELISA indirecto. T. FIFIS y cols. (1991) observan que la proteína MPB70 puede mostrar otros pesos moleculares dependiendo de los carbohidratos asociados a MPB70, poniendo en evidencia la existencia de formas glucosadas de esta proteína, así ellos descri-

ben que una proteína MPB70 de 25 kDa que contiene arabinosa y manosa, otra de 22 kDa que además de los azúcares anteriores contiene xilosa y una última proteína MPB70 de 22 kDa no glucosada. La forma más frecuente encontrada en los cultivos viejos es la de 22 kDa que representa la forma puramente proteica de MPB70.

M. HARBOE y cols. (1990) utilizan la técnica ELISA con antígeno MPB70 en ganado vacuno infectado de forma artificial por *M.bovis*, *M.avium subsp. avium* y ganado vacuno y caprino infectado de forma natural por *M.avium subsp. paratuberculosis* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* obteniendo una alta sensibilidad y especificidad de este método para detectar la infección por *M.bovis*, no obteniendo reacciones cruzadas con animales infectados por *M.avium subsp. avium*, *M.avium subsp. paratuberculosis* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Concluyendo con que la formación de anticuerpos frente al antígeno MPB70 es claramente específica de la infección por *M.bovis*. Resultados similares hemos obtenido en nuestra experiencia para el ganado caprino infectado en este caso de forma natural por *M.bovis*, *M.avium subsp. paratuberculosis* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Si bien nosotros no hemos podido calcular la sensibilidad y la especificidad de este antígeno mediante la técnica ELISA, si que hemos obtenido muy buenos resultados: de 32 cabras infectadas por *M.bovis* las 32 son detectadas con este antígeno, de 15 caprinos infectados por *M.avium subsp. paratuberculosis* ninguno es detectado por dicho antígeno, igualmente ocurrió con los 5 caprinos infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* que seroconvirtieron a negativos. Observamos como nuestros resultados y los de **M. HARBOE y cols. (1990)** no coinciden con los de **P.R. WOOD y cols. (1992)**, ya que estos últimos obtuvieron una sensibilidad para la técnica ELISA en el diagnóstico de la infección por *M.bovis* de 18.1 p.100. Pensamos que tal discordancia pudiera ser debida a la distinta metodología seguida en el desarrollo de dicha técnica con el MPB70 por parte de estos últimos autores, ya que utilizan distinta concentración de antígeno, distintos tiempos de incubación y otras sustancias amortiguadoras que las utilizadas por nosotros y por **M. HARBOE y cols. (1990)**.

Es digno de mención que en todos los casos hemos trabajado con animales infectados de forma natural con cualquiera de las especies citadas que, si bien significó una dificultad superior a la hora de diagnosticarlos convenientemente y encuadrarlos en cada uno de los grupos experimentales estudiados (Tabla II), suponen sin duda la forma más idónea de evaluar la utilidad de una técnica de

natural de una infección.

En nuestra experiencia hemos trabajado con una modificación de la técnica ELISA utilizada por M. HARBOE y cols. (1990).

En nuestra estandarización a pesar de que la dilución de antígeno de 3 $\mu\text{g/pocillo}$ producía la máxima discriminación entre el suero positivo y el negativo, la dilución de 0,5 $\mu\text{g/pocillo}$ dio un nivel de discriminación suficiente para diferenciar con buen margen de seguridad ambos sueros, además de comportarse como la dilución de antígeno que menos variación individual produjo en las densidades ópticas de los sueros probados. De esta forma hemos utilizado la misma concentración de antígeno que la empleada por M. HARBOE y cols. (1990) y S. NAGAI y cols. (1981). Si bien T. FIFIS y cols. (1989) usaron 0.3 $\mu\text{g/pocillo}$. Todas las soluciones que hemos utilizado fueron exactamente las descritas previamente por dichos autores, obtuvimos que la dilución óptima de los sueros problemas tras nuestra estandarización era 1:50 al igual que previamente fue descrito por dichos autores. Utilizamos en nuestra técnica ELISA una anti-IgG de caprino hecha en conejo en lugar de la proteína G utilizada por los anteriores ya que ellos trabajaron con distintas especies animales y nosotros únicamente con ganado caprino. Se respetaron asimismo todos los tiempos de incubación.

P.R. WOOD y cols. (1992) trabajaron con 2 $\mu\text{g/ml}$, o sea, 0.2 μg de antígeno por pocillo frente a los 0.5 $\mu\text{g/pocillo}$ utilizados por S. NAGAI y cols. (1981), M. HARBOE y cols. (1990) y nosotros. Además incuban las placas tras colocar el antígeno durante una noche mientras que S. NAGAI y cols. (1981) ya recomendaban 48 h de incubación para este paso. Recomendaban también que cada una de las incubaciones fuera realizada a 37°C y P.R. WOOD y cols. (1992) han incubado a temperatura ambiente, y además han modificado la composición de las soluciones amortiguadoras y el pH de las mismas, variando asimismo el filtro de lectura empleando el de 450 nm, que debería ser de 405 nm tal como describieron previamente S. NAGAI Y COLS. (1981). Parece ser que P.R. WOOD y cols. (1992) utilizan una modificación de la técnica ELISA ensayada anteriormente por T. FIFIS y cols. (1989). No obstante estos últimos trabajan con las mismas soluciones, a los mismos pH y con los mismos filtros de 405 nm que S. NAGAI y col. (1981) y M. HARBOE y cols. (1990). También podríamos pensar que la diferencia en resultados ha sido debida a la estructura del antígeno MPB70 empleado, teniendo en cuenta que nosotros hemos trabajado con antígeno MPB70 extraído por el Dr. SADAMU NAGAI de la BCG

subcepa Tokio 172, de cultivos de cuatro semanas, o sea con la forma de MPB70 no glucosada y por lo que quizás hemos obtenido resultados similares a los de este y discordantes con los de P.R. WOOD y cols. (1992) que trabajaron con el antígeno obtenido por T. FIFIS y cols. (1989) de *BCG AN5* cuyo Pm podía oscilar entre los 20 y los 25 kDa dependiendo de los carbohidratos asociados, no obstante estos últimos autores obtienen resultados similares a los de S. NAGAI Y COLS (1981) y HARBOE y cols. (1990). Por lo que podría deducirse que la diferencia de los resultados obtenidos por P.R. WOOD y cols. (1992) pudiera ser debida a las modificaciones que ellos introducen en el desarrollo de la técnica.

Otro de los parámetros determinado fue la concentración óptima de conjugado. Se disponen en el mercado de una serie de enzimas conjugadas con posibilidades de utilizarse en la técnica ELISA a cada una de las cuales se les asocia una serie de ventajas e inconvenientes, entre ellas la peroxidasa utilizada por nosotros, T. FIFIS y cols.(1989), M. HARBOE y cols. (1990), P.R. WOOD y cols. (1992). Entre las ventajas de esta enzima destaca la mayor rapidez de reacción, y entre los inconvenientes la mayor posibilidad de contaminación, lo que determinaría el desarrollo de reacciones inespecíficas, o la necesidad de realizar las lecturas lo antes posible tras el frenado de la reacción, ya que el tiempo transcurrido después de esta, también incrementaría el desarrollo de este tipo de reacciones inespecíficas. No existen estudios comparativos entre la mayor o menor eficacia del uso de este u otro conjugado en la técnica ELISA con MPB70.

La utilización de este tipo de conjugado (peroxidasa) permite la utilización de distintos sustratos tales como el ABTS (2,2'-azino-di(ethyl-benzthiazolinesulfate) o el OPD (orto-fenil-diamina), el primero es utilizado por T. FIFIS y cols.(1989), M. HARBOE y cols. (1990), P.R. WOOD y cols. (1992). Nosotros hemos utilizado el OPD, que había sido utilizado anteriormente en esta técnica ELISA con antígeno MPB70, aún así decidimos para ver las posibilidades del mismo en esta técnica, a pesar de que a este se le asocian algunos inconvenientes como inestabilidad a la luz, por lo que dicha sustancia fue conservada en refrigeración en un frasco oscuro envuelto en papel de aluminio desde su preparación y hasta el corto período previo a su uso. La adición de la orto-fenil-diamina a la solución de sustrato se realizó justo momentos antes de su utilización y era contenida en un matraz envuelto en papel de aluminio para evitar así la acción de la luz sobre la misma. Si bien este cromógeno determina mayores absorbancias que el ABTS

CATTY y RAYKUNDALIA, 1988 cit. MOLINA (1992), al ser probado en nuestra estandarización con antígeno MPB70, con distintas concentraciones de antígeno y distintas diluciones de sueros positivos a *M.bovis* y de sueros negativos libres de agentes patógenos no se observó el desarrollo de reacciones inespecíficas, lo que justificó su utilización. La orto-fenil-diamina es utilizada por otros investigadores (**McFADDEN y HOUDAYER, 1988; CHARPIN y cols., 1990, CAMINERO, 1990**), también es recomendada por Laboratorios Biosell en su kit comercial para la técnica ELISA con antígeno 60, utilizada en el diagnóstico de la paratuberculosis.

Debido a la falta de unificación de criterios respecto a la metodología más idónea a emplear en el diagnóstico de la infección por *M.bovis* en especies animales con antígeno MPB70 usando la técnica ELISA, y dado que cualquiera de las modificaciones que se introducen en este método conllevan al ajuste de los restantes parámetros de esta técnica, junto con la no existencia comercial de dicho antígeno se hace imposible el establecer comparaciones con las densidades óptica obtenidas por otros investigadores

De los animales diagnosticados con una infección por *M.bovis* con la técnica intradérmica comparativa y que posteriormente dieron resultados positivos a la técnica ELISA con antígeno MPB70, se procesaron microbiológicamente dos de ellos y ambos fueron utilizados como controles positivos. Mostraron lesiones caseosas en pulmón y ganglios mediastínicos, lesiones macroscópicas similares a las descritas previamente en ganado caprino por otros autores (**MILNE, 1955; THOREL, 1984; ASHRAF y KHAN, 1989; BERNABE y cols., 1990-1991a**). Obviamente, de estos animales se aisló e identificó *Mycobacterium bovis*.

Previo a la siembra en medios específicos para micobacterias ha de realizarse una descontaminación de la muestra. Nosotros hemos empleado una modificación del método de Petrof descrita por **M.D. RODRIGUEZ y cols. (1983)**, en la que se utilizó una solución de sosa 1 p 100 y de ácido sulfúrico al 1 p 100. Si bien **L.A. CORNER y TRAJSTMAN (1988)** opinan que el hidróxido sódico y el ácido sulfúrico son tóxicos para las micobacterias disminuyendo el rango de crecimiento, nosotros hemos obtenido buenos resultados. **A. ORTEGA y MARCH (1979)** recomiendan la no utilización de hidróxido sódico al 4 p.100, concentración recomendada en el método de Petrof ya que es altamente lesiva para los bacilos tuberculosos y mucho más para las micobacterias atípicas. Así nosotros con la concentración de 1 p 100 de hidróxido sódico

hemos obtenido buenos resultados, pues en todos los casos esperados las micobacterias crecieron en el medio sin dificultad.

Para el procesado microbiológico de las muestras se utilizó el medio de Löwenstein Jensen recomendado por algunos autores para el crecimiento de *M.bovis* (ORTEGA y MARCH, 1979; CASAL y CLEMENTE, 1990; HERMOSO y CARDENAL, 1992). Todos ellos hacen mención a la necesidad del piruvato añadido al Löwenstein. No obstante J.M. GRANGE y cols. (1990) observan que aunque *M.bovis* crece preferentemente en medios que contengan piruvato, existen cepas en las que el requerimiento es mínimo, e incluso aquellas sin esta necesidad. Por esta razón y buscando otras micobacterias distintas a *M.bovis* utilizamos Löwenstein Jensen con piruvato y sin piruvato, obteniendo crecimiento en ambos tipos de Löwenstein, dando mayor número de colonias en aquel que lleva incorporado el piruvato en los dos animales, que posteriormente mediante pruebas bioquímicas fueron identificadas como *M.bovis* observándose lo anteriormente descrito por J.M. GRANGE y cols. (1990).

1.2.- REFERENTE AL EMPLEO DEL ANTIGENO A60.

La técnica ELISA con antígeno A60 es recomendada por los "Laboratorios Biosell" para el diagnóstico de la paratuberculosis. Es también utilizada en el diagnóstico de la tuberculosis humana por *M.tuberculosis* (COCITO y cols., 1987; McFADDEN y HOUDAYER, 1988; CHARPIN y cols., 1990, CAMINERO, 1990). Así solamente Procedimos a estandarizar la concentración óptima de conjugado, al no haber utilizado los reactivos que dichos laboratorios suministran con las placas antigenadas, ya que las diluciones de suero y de antígeno venían especificadas por la casa comercial.

Como sustrato utilizamos la "orto-fenil-diamina ya que es el cromógeno que incluye la casa comercial en el kit, aunque este al igual que los reactivos anteriores fue preparado por nosotros por motivos económicos.

Mediante la técnica ELISA con antígeno 60 hemos detectado positividad en todos los grupos de animales previamente diagnosticados con distintas infecciones. Ya R. MAES y BUFFEREAU (1989) detectan mediante la técnica ELISA con este antígeno animales infectados por *M. avium subesp. paratuberculosis* y *M.bovis*.

Nosotros además hemos detectado animales infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esto es fiel reflejo de los niveles de antigenicidad compartida que poseen los actinomicetales, y que podrían expresarse entre otros con antígeno A60

Por los resultados obtenidos el antígeno 60 no debería ser usado en el diagnóstico de la paratuberculosis en aquellas zonas en donde existan infecciones conjuntas por *M. bovis* y *M. avium subsp. paratuberculosis* tal como describe en Murcia A. BERNABE y cols. (1990-91) en ganado caprino. Tampoco se debería usar en zonas con infecciones muy extendidas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* tal como las Islas Canarias (REAL y cols., 1992). En cualquiera de estos casos obtendríamos reacciones positivas de difícil interpretación como animales infectados por *M. avium subsp. paratuberculosis*.

La firma comercial Biosell recomienda este antígeno para el diagnóstico de la paratuberculosis. No obstante nosotros detectamos demasiadas reacciones cruzadas en animales con otras infecciones. Sin embargo dicho antígeno parece dar muy buenos resultados en el diagnóstico de la tuberculosis en humana por *M. tuberculosis*, Si bien podría pensarse en esta especie en la aparición de reacciones cruzadas en individuos con la enfermedad de Crohn, J.J. MCFADDEN y HOUDAYER (1988) no observan reacciones con este antígeno salvo que exista una exposición previa a *M. tuberculosis* u otras micobacterias del medio ambiente.

1.3.- NIVEL DE ACUERDO MOSTRADO POR AMBOS ANTIGENOS

En nuestro estudio no hemos podido calcular la sensibilidad y especificidad del antígeno MPB70, ya que en condición indispensable para su cálculo utilizar animales libres de otras infecciones con una seguridad absoluta, es decir, deberíamos contar al menos con un grupo de animales libres de agentes patógenos y otros infectados de forma unilateral con distintas especies de actinomicetales u otros agentes, pero todos ellos perfectamente reconocidos y diagnosticados por otras técnicas consideradas standard, que no pudieran prestarse a ningún tipo de duda. Para ello es casi indispensable trabajar con infecciones experimentales artificialmente inducidas. Nosotros hemos trabajado con un amplio margen de seguridad máxime si tenemos en cuenta que hemos utilizado distintas técnicas para ir descartando distintos tipos de infecciones

producidas por micobacterias y otras bacterias cercanas con comunidad antigénica con las anteriores. Hemos creído conveniente por ello realizar una estimación estadística utilizando estimador "kappa" (MARTIN y cols., 1987) comparando los resultados obtenidos con la técnica ELISA con antígeno MPB70 y A60, con los resultados obtenidos con la técnica de la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina, todo ello para verificar el nivel de coincidencia en los resultados que ellas ofrecen.

La seguridad cualitativa de Kappa sugiere que si su valor es alto ambas técnicas diagnósticas están midiendo con una buena fiabilidad los resultados para las que fueron diseñadas. En la comparación de técnicas una kappa de 0.4-0.5 indica moderado nivel de acuerdo.

En nuestro caso el estimador Kappa toma valor 1, de lo que resulta una coincidencia real absoluta entre la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina y el ELISA indirecto con antígeno MPB70 en el diagnóstico de la tuberculosis caprina debida a *M.bovis*.

El estimador Kappa toma valor negativo, de lo que resulta que la coincidencia entre positivos y negativos obtenidos por intradermorreacción tuberculínica y la técnica ELISA con antígeno A60 se debe al azar, resultando además pruebas totalmente discordantes.

El estimador Kappa toma también valor negativo, cuando comparamos los resultados obtenidos con la técnica ELISA usando los antígenos A60 y MPB70, de lo que resulta que la coincidencia entre positivos y negativos se debe al azar, siendo además antígenos con resultados totalmente discordantes.

Según T. FIFIS y cols. (1989), M. HARBOE y cols. (1990) y J.F. GRIFFIN y cols. (1991) el antígeno MPB70 es uno de los componentes más inmunorreactivos de *M.bovis* detectando la mayoría de los animales infectados por dicha micobacteria, mostrando mediante el uso de la técnica ELISA una alta especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de la tuberculosis animal por *M.bovis*. En nuestra experiencia el 100 p 100 de los animales infectados por *M.bovis* seroconvirtieron a positivos a dicho antígeno mediante la técnica ELISA indirecto, pero ninguno de los animales infectados por *M.avium subsp. paratuberculosis* o *C. pseudotuberculosis* reaccionaron de esta manera, resultados similares a los obtenidos por dichos autores. Aunque ellos trabajaron con algunos

grupos de animales infectados de forma artificial y todos nuestros animales procedían de una infección natural.

Si bien T. FIFIS y cols. (1989) obtienen algunas reacciones cruzadas con *M. tuberculosis* nosotros no hemos podido constatar este hecho probablemente debido a la inexistencia o en su caso, a la baja frecuencia en nuestra isla de tuberculosis caprina debida a dicha micobacteria como se desprende del estudio realizado por B. ACOSTA y cols. (1993) en el que *M. bovis* es el principal agente etiológico implicado en la tuberculosis del ganado caprino de las islas de Gran Canaria y Tenerife, habiendo detectado algún caso aislado por *M. kansasii*.

Ni nuestros resultados ni los obtenidos por T. FIFIS y cols. (1989), M. HARBOE y cols. (1990) y J.F. GRIFFIN y cols. (1991) concuerdan con los obtenidos por P.R. WOOD y cols. (1992) que obtienen mediante la técnica ELISA una especificidad alta del 96,4 p.100 pero una sensibilidad baja de 18.1 p.100, datos que tampoco concuerdan con los obtenidos por J.R. FLAMAND y cols. (1994).

Es importante reseñar que en nuestro estudio de 32 cabras infectadas por *M. bovis* el 100 p 100 seroconvirtieron a positivos mediante la técnica ELISA con antígeno MPB70 y tan sólo un 59.3 p 100 resultaron positivas con antígeno A60. En ganado caprino infectado por *M. avium subsp. paratuberculosis* ningún animal del grupo seroconvirtió a positivo con el antígeno MPB70, siendo detectados con antígeno A60 un 86.8 p 100. Asimismo, ningún animal del grupo de cabras infectadas por *C. pseudotuberculosis* seroconvirtió a positivo con antígeno MPB70, resultando un 40 p 100 de seropositividad cuando se empleó el antígeno A60.

De todo esto deducimos la importancia que podría tener la utilización de ambos antígenos en la técnica ELISA en lugares con infección conocida bien por *M. avium subsp. paratuberculosis* o por *C. pseudotuberculosis* o ambas, en el diagnóstico de la infección por *M. bovis*. Pudiendo así detectarse aquellos animales infectados por *M. bovis*, de los que sufren una infección por otros actinomicetales.

2.- INFLUENCIA DE REALIZAR INTRADERMORREACCIONES TUBERCULINICAS SUCESIVAS EN GANADO CAPRINO UTILIZANDO LA TECNICA COMPARATIVA

J. RODRIGUEZ y cols. (1989) realizaron en el ganado caprino de Navarra un estudio sobre el grosor de la piel de los mismos y encontraron valores que oscilaron entre 2 y 2.5 mm de grosor.

Nosotros hemos obtenido valores mínimos del grosor de la piel del ganado caprino de la "Agrupación Caprina Canaria" similares a los obtenidos por **J. RODRIGUEZ y cols. (1989)**. No obstante aunque no podemos ni pretendemos extrapolar nuestros resultados al valor medio de cabras de nuestra raza, el valor máximo obtenido en cabras sanas (Tabla III) de nuestra agrupación es de 4 mm, frente a los 2.5 obtenidos por los anteriores. Esto es un punto muy importante a la hora de realizar la técnica intradérmica, ya que deberemos de realizar una medición de la piel antes de la inoculación de los animales con PPD pues el ganado caprino de diferentes razas, incluso dentro de un misma raza puede ofrecer variaciones en el grosor de la piel. Cabe esperar además que teniendo en cuenta que las cabras de la "Agrupación Caprina Canaria" se corresponde fenotípicamente con una amplia variabilidad de caracteres, el grosor de la piel de cabras de diferentes áreas geográficas podría variar dentro de un extenso rango de valores. Datos de gran importancia teniendo en cuenta que la normativa comunitaria vigente considera dudosos aquellos animales que desarrollan tras la tuberculinización un aumento de grosor de la piel entre 2-4 mm, el mínimo de estos valores es exactamente igual que la diferencia existente entre el valor máximo y mínimo obtenido en el ganado caprino de nuestra agrupación.

En nuestro país la lucha de la tuberculosis en ganado vacuno se rige por nuestra legislación vigente adecuada a los criterios comunitarios. Para el diagnóstico de la tuberculosis caprina no existen medidas reglamentarias, basándose actualmente en nuestro país en las mismas bases legislativas que para el ganado vacuno (**ANONIMO, 1985**). Para algunos autores (**THOREL, 1980, 1984**) la cabra se mantiene en los mismos niveles (en cuanto a dosis de tuberculina, punto de inoculación y mm a partir de los que se considera a un animal positivo) que el ganado vacuno. Otros, sin embargo, opinan que la lectura ha de realizarse a las 48 h post-inoculación (**SHAROV, 1986**). **G.M. ALLEN y cols, (1987)** opinan que la lectura ha de realizarse a las 72 h y consideran como

reacción positiva una hinchazón visible y palpable o un incremento de grosor de 2 mm o más, o simplemente la aparición de inflamación y edema. Nosotros hemos elegido las indicaciones de A.N. SHAROV (1986) que realiza la lectura en ganado caprino a las 48 h pos-inoculación con muy buenos resultados, al igual que M. HARBOE y cols. (1990) en ganado vacuno.

Existe controversia en la sensibilidad y especificidad que esta técnica intradérmica presenta en el ganado caprino máxime si tenemos en cuenta que la cabra puede afectarse por otras patologías infecciosas producidas por otras micobacteria e incluso bacterias pertenecientes a géneros cercanos como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Así C.O. THOEN y cols. (1984) obtienen que la técnica tiene una alta sensibilidad y una baja especificidad, al igual que Y.S. LU y cols. (1992) que de tres caprino positivos a la prueba de la tuberculina tan solo en uno aísla *M.bovis* y de los otros dos *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Asimismo B. ACOSTA y cols. (1993) aíslan de caprinos positivos a la tuberculina *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Sin embargo G. PERRIN y cols. (1984) obtienen que es una técnica muy específica en el ganado caprino. Por todo ello R.L. SANSON (1988) opina que existe la necesidad de fijar los valores de sensibilidad y la especificidad de esta técnica en ganado caprino.

2.1.- EN EL GRUPO DE CABRAS APARENTEMENTE SANAS.

Trabajamos con un grupo de animales considerados exentos de infección por *M.bovis* y *M.avium*, diagnosticados como tal mediante la técnica de la intradermorreacción tuberculínica comparada, que ofrece una alta sensibilidad (THOEN y cols., 1984; PERRIN y cols., 1984; ALLEN y cols., 1987; LU y cols., 1992) y sugerida como un buen método de diagnóstico de la tuberculosis en ganado caprino (THOEN y cols., 1984). Si bien son muchos los autores como decíamos anteriormente que dan a la técnica una baja especificidad, todos ellos coinciden en su alta sensibilidad razón por la que se eligió esta técnica para así evitar la presencia en nuestra experiencia de animales con otras infecciones que podrían dar lugar a reacciones cruzadas tanto en la tuberculinización como en el posterior estudio serológico. Además trabajamos con un alto margen de seguridad de que nuestros animales estaban libres de infección por *M.avium subsp. paratuberculosis* debido a estudios previos realizados mediante la técnica del γ -interferón bovino por J.

MOLINA y cols. (1991) considerando a las islas como libres de esta enfermedad, y de la infección por *C.pseudotuberculosis* pues en ningún caso estos animales presentaron indicios de infección. Sin embargo, hay que reconocer que estos animales no pertenecen a un lote de cabras libres de agentes patógenos específicos. Para asegurar más los resultados los animales fueron elegidos de una explotación sin antecedentes de paratuberculosis, pseudotuberculosis ni tuberculosis, ya que como describe **F. REAL y cols. (1993)** en nuestra zona existe pseudotuberculosis caprina extendida de forma endémica.

Dada la controversia existente en cuanto a la interpretación de la técnica en ganado caprino nos basamos en la actual Orden Ministerial 647/86 (1986), considerando dudosos aumentos de grosor de la piel entre 2 y 4 mm, y positivos mayor de 4 mm. Si bien **L.M. O´REILLY (1986)** opina que una interpretación más severa de la tuberculinización simple aumentaría la sensibilidad de la técnica. Nosotros tenemos un margen de error pequeño al haber trabajado con la intradermorreacción comparativa, aunque **A. BERNABE y cols. (1991)** recomiendan usar en esta técnica comparativa la johnina en vez de PPD aviar para descartar con más seguridad paratuberculosis. Todos los animales que formaron parte de la experiencia dieron resultados negativos a la intradermorreacción comparativa antes del comienzo de la misma.

C.O. THOENS y cols. (1984) recomiendan respetar un plazo de 60 días entre intradermorreacciones y **B.L. RANDUZ y LEPPER (1985)** lo vuelven a confirmar.

En un enfoque global hemos obtenido que tras sucesivas tuberculinizaciones con PPD bovina y PPD aviar cuando estas están separadas por quince o más días (en individuos sanos) es prácticamente nula la posibilidad de obtener falsos positivos que sean detectados por la técnica de la tuberculinización comparativa.

En un animal del lote 6 que recibió seis dosis de PPD bovina y otras tantas de PPD aviar con intervalo de quince días entre ellas mostró tras la tercera dosis de PPD la presencia de respuesta humoral detectado mediante la técnica ELISA con antígeno MPB70 que es específico de *M.bovis BCG* (**HARBOE y cols., 1990**). Al finalizar la experiencia el animal fue sacrificado no mostrando lesiones aparentes de tuberculosis, paratuberculosis o pseudotuberculosis. Ningún otro animal de la experiencia mostró reacción positiva a la técnica ELISA con antígeno MPB70. Esta reacción

podría ser debida a que el antígeno MPB70 forma parte de la PPD bovina. M. HARBOE y cols. (1990) ya con seis PPD bovinas preparadas de diferentes cepas de *M. bovis* detectaron mediante la técnica de *dot blot* con anti-MPB70 una clara reacción positiva. La presencia de MPB70 en PPD bovino fue confirmada anteriormente por S. NAGAI y cols. (1984), que descubrieron al antígeno MPB70 como una de las proteínas más termoestables presentes en las micobacterias. Después de haber sido calentada a 120°C durante 15 minutos tenía capacidad de inhibición puesta de manifiesto mediante la inhibición de un radioinmunoensayo presentando similar banda de precipitación que la obtenida con MPB70 no tratada por el calor. Este antígeno es un inmunógeno potente (FIFIS y cols., 1989) y podría pensarse en la posibilidad de que este animal desarrollara anticuerpos frente al mismo. El que se detecte en un solo animal de la experiencia hace pensar en que sea debido a la idiosincrasia propia del animal, apoyándonos en los resultados obtenidos por M. HARBOE y cols. (1990) que afirman que la formación de anticuerpos anti-MPB70 en ganado vacuno tuberculizados con PPD depende de diferentes factores pero que en animales sanos no induce a un incremento significativo de la producción de anti-MPB70. Aún habiendo sido estos tuberculizados cuatro veces con distintos intervalos de intertuberculización, ellos usaron para la experiencia vacunos libres de agentes patógenos, PPD bovina y las inoculaciones las realizaron en la 0, 10, 14 y 16 semanas, la lectura la realizaron al igual que nosotros a las 48 h post-inoculación. Estos autores obtienen estos mismos resultados cuando la técnica de la intradermorreacción tuberculínica la realizan con johnina. No obstante obtienen al igual que nosotros al usar la PPD bovina un animal que tras las sucesivas tuberculizaciones presentó valores de densidad óptica más elevados que los demás animales pero en su caso esto valores no llegaron al punto de corte al que si llegó nuestra cabra.

M. HARBOE y cols. (1990) compararon sus resultados con los obtenidos con la técnica ELISA con antígeno BCG85 obteniendo valores similares a los obtenidos con antígeno MPB70.

Estos opinan basándose en observaciones previas en otras especies que un aumento de los anticuerpos anti-MPB70 después de tuberculizar no se esperaba. Un aumento de la respuesta humoral anti-MPB70 no se observaba después de tuberculizar a humanos y ratones. Siempre en la especie humana la intradermorreacción se realiza con PPD preparada de *M. tuberculosis*, micobacteria que contiene una cantidad mínima de MPB70, y otros antígenos.

nos contenidos en dicha PPD son desnaturalizados durante la preparación de la misma. En ganado vacuno estudios previos han demostrado un aumento de anticuerpos anti-micobacteriales (RICHARDS y cols., 1966 y YUGI y NOZAKI, 1972, cit. ambos HARBOE y cols., 1990, RITACO y cols., 1987; THOEN y cols., 1983). M. HARBOE y cols. (1990) discuten que también podría influir la mayor cantidad de tuberculina utilizada en ganado vacuno con respecto a la utilizada en la especie humana. Además en esta última especie se utiliza la técnica intradérmica simple.

También se ha detectado (HARBOE y cols., 1990) en ganado vacuno infectado de forma artificial con la cepa de *M.bovis* BM228 que tras sucesivas tuberculinizaciones con PPD bovina después de la octava semana post-infección la curva obtenida con la intradermorreacción es inversa a la obtenida con la representación de las densidades óptica de la técnica ELISA con antígeno MPB70, llegando a descender la curva obtenida de la lectura de la intradermorreacción a los valores que no detectan individuos infectados. Este hecho es de considerable interés en relación con otras infecciones micobacteriales en las que una técnica intradérmica negativa suele darse en individuos con infecciones masivas. En ratones con infección por *M.lepraemurium* una técnica intradérmica negativa es debida a una predisposición genética primaria la cual produce una disminución de las defensas y la consecuente multiplicación masiva de *M.lepraemurium*. Al inocular ratones en los pulpejos con dosis mínimas de *M.lepraemurium* se detecta un aumento de la respuesta humoral que conlleva a una respuesta a la técnica intradérmica positiva. Si la cantidad de bacilo inoculado es excesiva se produce una generalización del proceso y una respuesta a la técnica intradérmica negativa.

Llama nuestra atención que en nuestra experiencia con cabras exentas de infección por *M.bovis* (Tablas VI y VIII, Figuras XV, XVII, XVIII, XX, XXIV, XXVI) y repetidamente tuberculinizado observamos efectos inversos a los descritos por M. HARBOE y cols. (1990) quienes describen un aumento de la respuesta humoral y una caída de la celular. En nuestros lotes 1,2,4, coincidiendo con la octava semana después de la primera intradermorreacción se produce un ascenso de la respuesta celular y una leve caída de la humoral. No se detecta este efecto en el lote 5 en el que tras la última intradermorreacción con PPD bovina la respuesta celular se mantiene en los mismos valores que antes de tuberculinizar decayendo sin embargo el nivel de inmunidad humoral. Tampoco se detecta en el lote 3 en el que la segunda y última dosis de PPD tiene

lugar a la sexta semana de la primera. No obstante dicho efecto no parece deberse al número de dosis de PPD que recibe cada animal pues el lote 5 recibe dos dosis de PPD bovina y aviar al igual que el lote 2 en distintos intervalos de tiempo, pero en esta última la experiencia no sobrepasa la sexta semana y el lote 2 recibe tres dosis de PPD. También observando las Figuras correspondientes al lote 1 (XXVII, XXVIII y XXIX), podemos observar como se vuelve a producir este efecto inverso entre intradermorreacción y el resultado de la técnica ELISA justo en la semana octava de nuestra experiencia. Si bien nuestra experiencia no puede ser comparada con la anterior pues nuestros animales están libres de infección por *M.bovis* y *M.avium subsp. paratuberculosis* y la técnica intradérmica da valores negativos y el método ELISA con antígeno MPB70 la densidad óptica alcanzada no llega al punto de corte, resultando por tanto estas diferencias de relativo interés en este grupo de animales.

2.2.- EN EL GRUPO DE CABRAS INFECTADAS CON *C.pseudotuberculosis*.

La pseudotuberculosis en el ganado caprino en las Islas de Gran Canaria y Lanzarote ha sido descrita previamente por F. REAL y cols.(1992) que observan después de realizar el recuento de los animales afectados que aproximadamente el 10 p.100 de los animales del rebaño siempre que sean hembras y en edad superior a los seis meses padecen un proceso que tiene como única manifestación clínica la aparición de un hinchazón en la región perineal que se extiende hasta el inicio de la ubre. El 20 p.100 del rebaño suele estar afectado de cuadros "clásicos" de pseudotuberculosis siendo tratados exclusivamente mediante la apertura artificial de los ganglios linfáticos afectados, coincidiendo con la localización preescapular y retromamaria que nosotros hemos encontrado en nuestro rebaño, sin embargo, y pesar de estar bastante difundida esta enfermedad, no conocemos con exactitud cual es su prevalencia en nuestra región. No obstante, como tan solo uno de los animales de nuestra experiencia fue sacrificado y presentaba una localización de la lesión a nivel preescapular no pudimos saber si la lesión retromamaria correspondía simplemente a una afección de dichos ganglios o por el contrario existía esa linfangitis perineal superficial que penetra en la ubre afectando al ganglio retromamario. Sin embargo al igual que lo descrito por F. REAL y cols. (1993) la presencia de lesiones en nuestro ganado no se acompañó

de ningún otro signo ni síntoma clínico. Tampoco el animal sacrificado presentó lesión interna de pseudotuberculosis tal como describe G. MÜLLER (1981). Hay también que contar con que el ganado había sido vacunado contra esta enfermedad con "linfovac" de Laboratorios "Ovejero".

Al principio de la experiencia obtuvimos una medida del grosor de la piel antes de tuberculinizar en todos los animales de 3 mm a diferencia que en la experiencia anterior en donde se observó un grosor entre 2-4 mm, siendo superior también al margen descrito en ganado caprino de Navarra por J. RODRIGUEZ y cols. (1989). Al contrario de lo reseñado por Y.S. LU y cols. (1992) y por B. ACOSTA y cols. (1993) tras la primera intradermorreacción tuberculínica realizada el día uno de la experiencia no se detecta ningún animal positivo coincidiendo con los resultados obtenidos por M. HARBOE y cols. (1990). En esta experiencia hemos realizado la técnica intradérmica basándonos exactamente en los mismos autores expuestos en el punto anterior.

Basándonos en los resultados obtenidos en esta primera intradermorreacción y teniendo en cuenta todo lo expuesto en el correspondiente apartado de Material y Métodos, consideramos a dicha explotación afectada de pseudotuberculosis y libre de tuberculosis y paratuberculosis. Además frente a esta última enfermedad nos apoyan al igual que en la experiencia anterior la consideración de Canarias como zona libre de paratuberculosis (MOLINA y cols., 1991).

Aunque si bien Y.S. LU y cols. (1992) y B. ACOSTA y cols. (1993) describen animales pseudotuberculosos que dan falsos resultados positivos a esta prueba en la primera intradermorreacción nosotros no lo hemos detectado, ni siquiera realizando intradermorreacciones sucesivas, aun siendo también descritos por distintos autores la existencia de comunidad antigénica entre el Género *Mycobacterium* y el Género *Corynebacterium* (CUMINS, 1962).

El punto de corte para la técnica ELISA con antígeno MPB70 quedó establecido tras estandarización de la técnica en una D.O. de 0.009. En esta experiencia tras exponer el suero obtenido tras sucesivas tuberculinizaciones de estos individuos pseudotuberculosos al antígeno MPB70 por ELISA indirecto hemos obtenido tres animales positivos (Tabla XII, Figura XXXIII) tras la tercera tuberculinización, la cual fue realizada a 15 días de la primera, obteniéndose unas densidades ópticas de los mismos de 0.001, 0.014 y 0.018

para los animales 1, 2 y 4, respectivamente. Tras la cuarta intradermorreacción todas las densidades ópticas vuelven a ser negativas, excepto el animal número 4 que aumenta la respuesta al MPB70 dando una D.O. de 0.023, tal como se observa en la Tabla XII, Figura XXXIII. M. HARBOE y cols. (1990) realizaron una experiencia similar a la nuestra con ganado caprino con infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis* pero no realizaron intradermorreacciones repetidas. Tuberculinizan usando la técnica comparativa con PPD bovina, aviar y johnina a seis animales recogiendo dos muestras de sangre a distintos intervalos después de tuberculinizar. Todos los animales mostraron densidades ópticas inferiores al punto de corte por ellos marcados que resultó en 0.050. Consideramos que los valores de positividad obtenidos en nuestra experiencia en este grupo de animales se han debido mayormente al corto período de intertuberculinización (7 días), más que a la infección por *C.pseudotuberculosis* si tomamos en cuenta la experiencia previa de M. HAROE y cols. (1990).

El punto de corte del antígeno A60 quedó establecido en nuestra experiencia para ganado caprino tras estandarización de la técnica ELISA indirecto en 0.396. Obtuvimos con este ELISA animales positivos al mismo, aún antes de ser tuberculinizados. Tal es el caso de los animales 3 y 4 en los que se obtuvo una D.O. al antígeno A60 de 0.434 y 0.4263, respectivamente. Tras la primera prueba de intradermorreacción tuberculínica estos animales dan D.O. negativas. No obstante en esta misma fase el animal número 1 muestra una D.O. de 0.414 para volver a ser negativo durante toda la experiencia. El animal número 3 tras la tercera tuberculinización muestra una D.O. de 0.434 para volver a ser negativa después de la cuarta prueba alérgica, comportamiento para el que no encontramos explicación en base a las experiencia que hemos realizado. Llama la atención la respuesta de los animales números 3 y 4 con D.O. superiores al punto de corte antes de ser tuberculinizado, lo que demuestra lo poca especificidad de dicho antígeno en el diagnóstico de la tuberculosis animal por *M.bovis*. Después de la segunda y de la tercera tuberculinización, las D.O. de este animal sufrieron un ascenso al punto de positividad para volver a decrecer por debajo de este nivel en la cuarta tuberculinización (Tabla XIII, Figura XXXIV). M. HARBOE y cols (1990) comparan sus resultados con la técnica ELISA utilizando el antígeno MPB70 en caprinos infectados por *M.paratuberculosis* y *C.pseudotuberculosis*, con los obtenidos con antígeno BCG85, observando que cuatro de los negativos con antígeno MPB70 daban fuertes reacciones positivas con el antígeno BCG85. Posteriormente demuestran anticuerpos

anti-*M.paratuberculosis* usando para ello dos técnicas: inmunodifusión y fijación del complemento .

Llama la atención observar como con el antígeno 60 mediante la técnica ELISA se detectan variaciones en la inmunidad humoral que parecen estar más debidas a la infección por *C.pseudotuberculosis* que a las sucesivas intradermorreacciones efectuadas, aunque en este caso también el animal número 4 mantiene índices de positividad tras sucesivas tuberculinizaciones excepto tras la segunda y la última tuberculinización.

No obstante las intradermorreacciones sucesivas tuvieron que influir de forma determinante en la respuesta, como sucedió cuando empleamos el antígeno MPB70 ya que el período de intertuberculinización fue de siete días. Y máxime si tenemos en cuenta que C. COCITO y cols. (1986) lo describen como un antígeno termoestable que entra a formar parte de la PPD y con alto poder inmunógeno.

Con estos resultados concluir que en animales infectados por *C.pseudotuberculosis* sucesivas tuberculinizaciones separadas por una semana no inducen a la aparición de falsos positivos cuando lo que se mide es la hipersensibilidad retardada, pero cuando lo que medimos es la respuesta humoral de estos, podemos obtener falsos positivos mediante la técnica ELISA, que vemos mayormente acentuados cuando utilizamos el antígeno A60, y también pero en menor proporción con el MPB70.

Debido a que el animal número cuatro se mostró positivo en distintos momentos para ambos antígenos fue sacrificado en busca de una posible tuberculosis, aunque en ningún momento mostró reacción de hipersensibilidad a la tuberculina bovina o aviar. Tras inspección minuciosa de la canal, vísceras y ganglios no se pudo poner de manifiesto lesión alguna que no fueran la propias de pseudotuberculosis. La siembra de dichas lesiones en medios para micobacterias (Löwenstein Jensen con piruvato y sin piruvato) no obtuvieron crecimiento alguno, por lo que podemos considerarlo como un falso resultado positivo al diagnóstico serológico de la infección por *M.bovis*.

Concluida esta experiencia de medición de respuesta celular y humoral en este grupo de caprinos se siguieron pautas similares a las realizadas por F. REAL y cols. (1993) para la obtención de la muestra y su posterior procesado microbiológico.

Una vez comprobado el crecimiento la identificación de especie bacteriana de cada una de las bacterias crecidas de cada animal se realizaron cinco galerías API CORYNE (Biomérieux, España) comprobándose en todas una excelente identificación de *C.pseudotuberculosis* y llamando nuestra atención el que todas las reacciones de la galería API en los cinco casos fueron idénticas, resultados similares a los obtenidos por REAL y cols. (1993).

3.- PREVALENCIA DE LA TUBERCULOSIS DEL GANADO CAPRINO DE LAS ISLAS DE GRAN CANARIA Y LANZAROTE MEDIANTE UN ELISA CON ANTIGENO MPB70.

No son muchas las provincias españolas en las que se han realizado estudios encaminados a verificar la existencia de tuberculosis caprina y mucho menos sobre su prevalencia.

Si bien antaño se consideró a la cabra como una especie resistente a la tuberculosis, estudios posteriores han puesto de manifiesto que esta no solo es posible, sino que puede llegar a alcanzar índices de prevalencia realmente preocupantes, máxime cuando estos animales conviven o viven cercanos a vacunos infectados bien por *M.bovis* o por *M.avium*.

La tuberculosis caprina es una enfermedad ampliamente extendida por distintos puntos del globo: Australia (MINISTRY OF AGRICULTURE, 1987; ALLEN y cols., 1987; COUSINS y cols., 1993), Francia (MILNE, 1955; DAVENAS y DABRIGEON, 1955; LESSLIE y cols., 1960; VIALIER y cols., 1983; PERRIN y cols., 1984); Inglaterra (SOLIMAN y cols, 1953; EDINGTON, 1989), USA (PLUM, 1935 cit. LUKE 1958), Uganda (CARMICHAEL, 1937), Tanganika (MILNE, 1955), Nigeria (ALAKU y MORUPPA, 1993), Alemania (STEIGLER, 1985 y 1986; BOROWKA, 1987; RUPPERT, 1992), Taiwan (LU y cols. 1992); Zambia (SHARMAN, 1985).

En nuestro país no se tuvo conocimiento de la existencia de la misma hasta 1987 por O.FUENTES que describió en Toledo la existencia de tuberculosis caprina por *M.bovis* en caprinos de raza murciano-granadina y por *M.avium subsp. paratuberculosis* en raza serrana. En este mismo año este mismo autor describe en la Provincia de Burgos la existencia de tuberculosis en esta especie

por *M.bovis*.

En 1989 J. RODRIGUEZ y cols. describen en la Comunidad Autónoma de Navarra tras analizar un total de 3360 cabras pertenecientes a 63 localidades resultó un solo animal positivo a la intradermorreacción tuberculínica y 11 resultaron dudosas en las cuales análisis posteriores no revelaron la existencia de tuberculosis. La prevalencia fue baja.

En la Comunidad Autónoma de Murcia A. VERA y cols. (1989) y posteriormente A. BERNABE y cols. (1990-9 (A-B) y 1991) describen tuberculosis caprina por *M.bovis* y algún caso aislado por *M.tuberculosis*, obteniendo una alta incidencia de esta enfermedad en el caprino de la zona.

Por último en el año 1993, B. ACOSTA y cols. describen también dicha enfermedad afectando al caprino de la Comunidad Autónoma Canaria debiéndose en la mayoría de los casos a *M.bovis* salvo algún caso aislado por *M.kansasii*.

Nuestra experiencia fue realizada en esta última Comunidad Autónoma, concretamente en la Provincia de Las Palmas, en las Islas de Gran Canaria y Lanzarote. En la primera de ellas se muestrearon 56 explotaciones, el total de animales analizados fue de 780 y se obtuvo un resultado de 29 explotaciones positivas (Tabla XV). Resultando un total de 64 animales positivos. Sus densidades ópticas oscilaron entre 0.009-0.074 (Tabla XVI). Los animales hacía un año que no recibían ninguna dosis de PPD, por lo que la positividad no pudo deberse a un error en la aplicación de esta técnica diagnóstica por no respetar el tiempo considerado mínimo de intertuberculinización. Se obtiene una prevalencia del 8,2 p.100 de tuberculosis caprina en la isla de Gran Canaria.

En la isla de Lanzarote se muestrearon un total de 64 explotaciones, resultando un total de animales analizados de 570, de los cuales dieron positivos al ELISA con antígeno MPB70 44 caprinos. Resultando una prevalencia de 7.7 p.100. Las densidades ópticas oscilaron entre 0.009-0.107, tal como se observa en la Tabla XIII.

Aún sabiendo de la existencia de tuberculosis caprina en otras provincias españolas, no hemos encontrado datos exactos sobre la prevalencia en las mismas razón por la cual no hemos podido contrastar nuestros resultados.

Si que los podemos comparar con las incidencias de esta infección publicadas por Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1991 y 1992) en el ganado vacuno de esta Comunidad, y teniendo en cuenta que en las campañas de saneamiento ganadero se utiliza para el diagnóstico de la tuberculosis la técnica de la intradermorreacción tuberculínica (tenemos que en el año 1991 resultó una incidencia de 1.50 p.100 y en el año 1992 de 1.49 p.100). Nuestros resultados son preocupantes.

El antígeno MPB70 utilizando la técnica ELISA, no muestra reacciones cruzadas con *M.avium subsp avium*, *M.avium subsp. paratuberculosis* ni con *Corynebacterium pseudotuberculosis*, observándose que la formación de anticuerpos al antígeno MPB70 es altamente específica de la infección por *M.bovis*, lo que puede significar un aumento de la especificidad de los procedimientos de diagnóstico en la infección natural por *M.bovis* (HARBOE y cols., 1990). Recientemente ha sido estudiado en el diagnóstico de la tuberculosis en orix (*Oryx leucoryx*) mostrando falsos negativos a la técnica pero nunca falsos positivos (FLAMAND y cols., 1994).

Esto podría explicarse como resultado de las campañas de saneamiento anteriormente realizadas en este ganado, en el que nos consta que los animales positivos han sido sacrificado años tras año. Podría pues deberse a que los animales han mantenido un contacto con vacuno tuberculoso, ganado en el que si se tienen resultados positivos a la intradermorreacción, sabemos que la técnica intradérmica puede dar falsos positivos en período de infección reciente (TIZARD, 1987), o bien podría suceder que la infección ha sido mantenida durante años por el ganado caprino en Canarias.

Al fin y al cabo las campañas de saneamiento frente a esta enfermedad son relativamente recientes en nuestra Comunidad. Además no podemos olvidar que la sensibilidad y la especificidad de la técnica ELISA con antígeno MPB70 para investigar animales infectados por *M.bovis* son muy elevadas (FIFIS y cols., 1989, HARBOE y cols., 1990 y GRIFFIN y cols., 1991), y por tanto, la prevalencia obtenida por nosotros en Gran Canaria y Lanzarote está muy lejos de resultar aleatoria o inexacta.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Con el antígeno MPB70 mediante el método ELISA indirecto hemos detectado todos los animales infectados por *Mycobacterium bovis* y ninguno de los infectados por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mostrándose muy eficaz para detectar la infección natural por *M.bovis*.
- 2.- Con el antígeno A60 mediante el mismo método hemos detectado el 59,3 p 100 de las cabras infectadas por *Mycobacterium bovis*, el 86,8 p 100 de las infectadas por *Mycobacterium avium subsp. paratuerculosis* y el 40 p 100 de las infectadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, demostrando una relativa utilidad en el diagnóstico de las infecciones naturales por actinomicetales en ganado caprino.
- 3.- Existe una coincidencia absoluta en los resultados que ofrece la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina y la técnica ELISA indirecta con el antígeno MPB70 en el diagnóstico de la infección natural por *Mycobacterium bovis* en ganado caprino (Kappa = 1).
- 4.- Resultan métodos totalmente discordantes la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina y el ELISA indirecto con el antígeno A60, así como la técnica ELISA con el antígeno MPB70 y con el antígeno A60 en el diagnóstico de la infección por *Mycobacterium bovis* en el ganado caprino (Kappa = -0,154).
- 5.- El empleo de los antígenos MPB70 y A60 mediante el método ELISA indirecto resulta muy útil para determinar si una infección es producida por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sobretodo si se combina con los resultados de la técnica de la intradermorreacción tuberculínica.
- 6.- A pesar de que no se recomienda realizar intradermorreacciones tuberculínicas sucesivas en ganado caprino con intervalos inferiores a 60 días, quince días es tiempo suficiente para que no se produzca la aparición de falsos resultados positivos con este método en animales sanos.

7.- Un período de intertuberculinización de quince días en ganado caprino sano provoca un incremento de la inmunidad humoral, con la aparición de falsos resultados positivos con la técnica ELISA con el antígeno MPB70.

8.- Intradermorreacciones tuberculínicas sucesivas realizadas con intervalo de una semana en ganado caprino infectado de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis* no induce a la creación de hipersensibilidad retardada, pero sí a un aumento de la inmunidad humoral detectado mediante el método ELISA indirecto con el antígeno A60 y MPB70.

9.- La prevalencia de la infección por *Mycobacterium bovis* hasta 1992 medida por el método ELISA indirecto con el antígeno MPB70, es en la isla de Gran Canaria de 8,2 p 100 y en la isla de Lanzarote de 7,7 p 100.

RESUMEN

En nuestra experiencia hemos trabajado con la técnica ELISA indirecto con antígenos A60 y MPB70 utilizando grupos de animales infectados naturalmente por distintas especies de actinomicetales.

Para el desarrollo de esta trabajo hemos utilizado el antígeno MPB70, que nos fue remitido por el Dr. Sadamu Nagai. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida obtuvimos que dicho antígeno se encontraba en estado puro y que su peso molecular estaba próximo a los 18 kDa.

Hemos realizado la estandarización de la técnica ELISA con este antígeno y hemos obtenido que la concentración óptima de antígeno por pocillo es de 0.5 μg /pocillo, la dilución de los sueros problemas y testigos más adecuada es al 1/50 y la dilución de conjugado de 1/3000. Para la técnica ELISA con antígeno A60 hemos utilizado placas antigenadas de Laboratorios Biosell. Hemos trabajado con una concentración de antígeno de 0,6 μg /pocillo, los sueros fueron diluidos al 1//50 y tras estandarización obtuvimos una dilución óptima del conjugado de 1/4000.

Para evaluar la utilidad de la técnica ELISA con ambos antígenos en el diagnóstico de la infección por *M.bovis* hemos utilizado varios grupos de animales. Hemos obtenido que de 32 cabras infectadas por *M.bovis* el 100 p 100 seroconvirtieron a positivos mediante la técnica ELISA con antígeno MPB70 y tan sólo un 59.3 p 100 resultaron positivas con antígeno A60. De las 15 caras infectadas por *M.avium subsp. paratuberculosis* ningún animal del grupo seroconvirtió a positivo con el antígeno MPB70, siendo detectados con antígeno A60 un 86.8 p 100. Así mismo, ningún animal del grupo de 5 cabras infectadas por *C.pseudotuberculosis* seroconvirtió a positivo con antígeno MPB70, resultando un 40 p 100 de seropositividad cuando se empleó el antígeno A60.

Comparando el nivel de acuerdo de los resultados que ofrecen la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina y la técnica ELISA con el antígeno MPB70 obtenemos una coincidencia absoluta ($\text{Kappa} = 1$). Pero si comparamos la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina y el método ELISA con el antígeno A60 no existe ninguna coincidencia, resultando pruebas totalmente discordantes ($\text{Kappa} = -0,154$).

También hemos trabajado realizando intradermorreacciones sucesivas utilizando la técnica comparativa en la región del cuello

con PPD bovina y aviar en 21 cabras sanas y 5 infectadas por *C.pseudotuberculosis*, resultando que intradermorreacciones sucesivas realizadas en cabras sanas y separadas por quince días o más, difícilmente conllevan a la obtención de falsos positivos, mediante esta técnica. Similares resultados se obtuvieron en el grupo infectado por *C.pseudotuberculosis* cuando en período de intertuberculinización era como mínimo de una semana. No obstante estas intradermorreacciones sucesivas en ambos grupos inducen a la larga a un alza en la inmunidad humoral que puede ser detectada mediante la técnica ELISA indirecto con los antígenos A60 y MPB70.

La prevalencia de la infección por *M.bovis* medida mediante el método ELISA indirecto con el antígeno MPB70 en las islas de Gran Canaria y Lanzarote, tras muestreo estratificado de las poblaciones resultó en 8,2 y 7,7 p 100, respectivamente.

SUMMARY

We have worked with indirect ELISA test with A60 and MPB70 antigens and different groups of animals naturally infected by *Actinomyces* spp.

Antigen MPB70 was sent from Japan by Dr. Sadamu Nagai. By polyacrylamide gel electrophoresis we showed this antigen as pure and its molecular weight close to 18 kDa.

Standardization of ELISA test with MPB70 antigen offered the next results: 0,5 µg/well of antigen, dilution of controls and samples sera to 1/50 and dilution of anti-IgG goat peroxidase to 1/3000. For ELISA test with A60 antigen we led the instructions from Biosell Company, 0,6 µg/well of antigen, dilution of controls and samples sera to 1/50 and anti-IgG goat peroxidase to 1/4000.

To evaluate the utility of the ELISA test both antigens for diagnosing of *M. bovis* infection we have used different groups of animals. From 32 infected goats by *M. bovis* 100 per 1000 were positives by ELISA test with MPB70 antigen and only 59,3 per 100 were positives with A60 antigen. From 15 infected goats by *M. avium subsp. paratuberculosis* no animal were positives with MPB70 antigen, and 86,6 per 100 were it with A60 antigen. In the same way from 5 infected goats by *C. pseudotuberculosis* no animal were positives with MPB70 antigen, and 40 per 100 were positives with A60 antigen in the ELISA test.

In comparison an obvious measure of agreement between intradermal tuberculin test with mammalian PPD and ELISA test with MPB70 antigen indicates perfect agreement (Kappa = 1). But in the comparison of intradermal tuberculin test with mammalian PPD and ELISA test with A60 antigen, or ELISA test with MPB70 and A60 antigens indicate no agreement among them (Kappa = -0,154).

We have also done successive comparative intradermal tuberculin test with mammalian and avian tuberculin in the cervical area on 21 healthy goats and 5 infected goats by *C. pseudotuberculosis* and we got that these successive test on healthy goats separated for a fortnight do not produce false positive results. In the same way we got the results of the *C. pseudotuberculosis* infected goats being the test separated for only on one week. But the inoculation of PPD produces after sometime an increase of the humoral immunity which can be detected by ELISA test with A60 and MPB70 antigens.

Prevalence of the *M. bovis* infection measured by ELISA test with MPB70 antigen in Gran Canaria and Lanzarote islands was 8,2 and 7,7 per 100, respectively.

BIBLIOGRAFIA

Abou-Zeid, C., Harboe, M. and Rook, G. (1987) Characterization of the secreted antigens of *Mycobacterium bovis* BCG: Comparison of the 46-kilodalton Dimeric-Protein with proteis MPB64 and MPB70. *Infect. Immun.* 55, 3213-3214.

Abou-Zeid, C., Harboe, M., Sundsten, B. and Cocito, C. (1985) Cross-reactivity of antigens from the citoplasm and cell walls of some corynebacteria and mycobacteria. *J. Infect. Dis.* 41, 217.

Acha, P.N. and Szyfres, B. (1986) Tuberculosis zoonótica. en "Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales". Ed. *Organización Panamericana de la Salud*, Washington. pp. 174

Acosta, B., Real, F., Ferrer, O. y Déniz, S. (1993) Tuberculosis caprina en Gran Canaria y Tenerife. *SEOC*, Albacete, 23-25 Septiembre.

Alaku, S.O. and Moruppa, S.M. (1993) Tuberculosis condemnations in livestock slaughtered for meat in northeastern Nigeria. *Prevent. Vet. Med.* 15, 67-72.

Alfred, G. and Karlson, D. (1980) Género *Mycobacterium*. en "Bacteriología y Virología Veterinaria". Eds. Merchant, J.A. and Packer, R.A. Eds. *Acribia*, Zaragoza. pp. 453-477

Alfredsen, S.A., Buran, S. and Schwencke, H. (1990) Avian tuberculosis (mycobacteriosis) in cattle. Diagnosis and meat inspection. *Norsk Veterinartidsskrift* 102(7), 513-516.

Allen, G.M. and Sanson, R.L. (1987) Tuberculosis in goats. *Veterinary Continuing Education* 115, 69-71.

Alvarez, J.L., Samaniego, J.C., Bonilla, O.P., Rodríguez, F.N. y Sanz, M.B. (1981) Lucha contra la tuberculosis. Enfermedades animales de mayor repercusión socioeconómica. *El Campo*. (Boletín de Información Agraria del Banco de Bilbao), Bilbao. 83, 56.

American Thoracic and Society. (1981) The tuberculin test. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124, 356-364.

Andersen, W.I. and King, J.M. (1993) *Mycobacterium avium* infection in a pygmy goat. *Vet. Rec.* 13, 502-503.

Anónimo, (1985) Maladies infectieuses chroniques. "Tuberculose et paratuberculose: u mise au point". *Chev.* 146, 33-34.

Anzai, T., Kamada, M., Kanemaru, T. and Oikawa, M. (1989) Isolation of *Mycobacterium avium* complex from a thoroughbred racehorse with fatal pneumonia. *Bull. Equine Res. Int. Japan* 26, 73-77.

Arloing, S. (1898) Agglutination de bacille de la tuberculosis variee. *C.R. Acad. Sci.* 126, 1398-1400.

Ashraf, M. and Khan, M.Z. (1989) Pathological lymph nodes associated with pneumonia, hidatidosis and tuberculosis in sheep and goats. *Pakistan Vet.* 9, 90-91.

Asselinaeu, C. and Asselineau, J. (1984) Waxes, mycosides and related compounds. In "The micobacteria". Eds. Kubica, G. and Wayne, L.G. *Marcel Dekker Inc, New York.* 345.

Astashova, E.A. and Kadochkin, A.M. (1989) Morphogenesis of the L form of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Moscow* 7, 31-34.

Auer, L.A. (1987) Assesment of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Aust. Vet. J.* 64, 172-176.

Auer, L.A. and Schleeauf, S.M. (1988) Antibodies to Mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 18, 51-61.

Balestrino, E.A., Daniel, T.M., Latini, O.A., Ma, Y. and Scocozza, J.B. (1984) Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull. Wld. Hlt. Org.* 62(5), 755-761.

Barrera, L. and Kantor, J.N. (1987) Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop. Geogr. Med.* 39, 222.

Barry, T., Glennon, T., Smith, T. and Gannon, F. (1993) Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. *Vet. Rec.* 16, 66-67.

Bartels, H. (1971) Tuberculosis. Micobacteriosis, en Inspección Veterinaria de la Carne. Eds. Bartels, H.. Ed. *Acribia*, Zaragoza. 190-212.

Bates, J.H., Stead, W.W. and Rado, T.A. (1976) Phage type of tubercle bacilli isolated from patients with two or more sites of organ involvement. *Am. Rev. Respir. Dis.* 114, 353-358.

Batish, V.K., Vadav, J.S. and Grover, S. (1989) Detection of tubercle bacilli in milk. *Livestock Adviser* 14, 38.

Benet, J.J. (1989) Control of bovine tuberculosis in France in 1988. *Epidemiologie et Santé Animale* 16, 49-56.

Benet, J. (1990) Las micobacteriosis-zoonosis. *Nuestra Cabaña* 7, 63-65.

Benham, P.F. and Broom, D.H. (1989) Interactions between cattle and badgers at pasture with reference to bovine tuberculosis. *Br. Vet. J.*, 145-226.

Benjamin, R.G. and Daniel, T.M. (1982) Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen "5". *Am. Rev. Respir. Dis* 126, 1013-1016.

Berga, A.M. (1988) Incidencia de la Sanidad Animal. Secretaría General Técnica. M.A.P.A., 243.

Berggren, S.A. (1977) Incidence of tuberculosis in BCG vaccinated and control cattle in relation to age distribution in Malawi. *British Vet. J.* 133, 490-494.

Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchen, V., Vera, A. and Sierra, M.A. (1990-91a) Morphology of caprine tuberculosis I. Pulmonary tuberculosis. *An. Vet. Murcia* 6-7, 9-20.

Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchen, V., Vera, A. and Sierra, M.A. (1990-91b) Morphology of caprine tuberculosis II. generalization of tuberculosis. *An. Vet. Murcia* 6-7, 21-29.

Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J.

and Sidrach, J. (1991) Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goat. *Small Rum. Res.* 5, 377-390.

Biberstein, E.L. (1990) *Mycobacterium species*. In "Review of Veterinary Microbiology". Eds. Biberstein, E.L. and Zee, Y.C.. *Blanford Scientific Publications Ltd.*, Oxford. 202

Billman-Jacobe, H., Carrigan, M., Cockram, F., Corner, L.A., Gill, I.J., Milner, A.R. and Wood, P.R. (1992) A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 69, 25-28.

Billon, R. (1944) Tuberculose de la chèvre. Tesis de doctorado. (Alford).

Blood, D.C. y Radostits, O.M. (1989) Tuberculosis causada por *Mycobacterium bovis*, en "Diseases caused by *Mycobacterium bovis*". Eds. Blood, D.C. and Radostits, O.M.. Saunders W.B., *Baillière Tindall*, London. 710

Bönicke, R. (1962) Identification of mycobacteria by biochemical methods. *Bull. Un. Int. Tuberk.* 32, 13.

Bojalil, L.F., Cerbon, J. and Trujillo, A. (1962) Adansonian classification on mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 28, 333.

Borowka, J. (1987) Results of official slaughter animal and meat inspection 1985. *Fleischwirtschaft* 67(5), 615.

Brown, S. and Petrof, S.A. (1918) The clinical value of complement fixation in pulmonary tuberculosis based on a study of 540 cases. *Am. Rev. Tuberc.* 2, 525-540.

Buergelt, C.D., Gree, S.L., Mayhew, I.G., Wilson, J.H. and Merritt, A.M. (1988) Avian mycobacteriosis in three horses. *Cornell. Veterinarian* 78, 365-380.

Calmels, J.R. and Bivert, H. (1952) Etude comparative de quelques milieux modernes utilisées pour l'isolement du bacille tuberculeux. *Ann. Instit. Pasteur* 83, 338-359.

Calmette, A. and Guérin, C. (1908) Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux culture sur la bile. *Acad. Sci.* 147, 1456-1459.

Cameron, C.M. and Purdom, M.R.(1971) Immunological and chemical characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls and protoplasm. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 43(4), 83-92.

Cameron, C.M. (1982) The immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Proc. Annu. Met. Goat. Prod. Dis.* 3, 458-468.

Caminero, J.A. (1989) Diagnóstico de la tuberculosis. *Canarias Méd.* 7(5), 27-35.

Caminero, J.A. (1990) Diagnóstico serológico de la tuberculosis y otras micobacteriosis. I. *Méd. Clin.* 94, 187-195.

Carmichael, J. (1941) Bovine tuberculosis in the tropics with special reference to Uganda. *Vet. J.* 97, 329.

Casabona, N., Fuente, T., Entraigas, J. and Pla, R. (1989) Evaluation of a phenoglycolipid antigen (PGL-Tb1) from tuberculosis in the serodiagnosis of tuberculosis: Comparison with PPD antigen. *Acta Leprosica* 7, 89-93.

Casal, M. y Clemente, M.J. (1989) Interés en microbiología clínica de una nueva técnica de microscopía para el diagnóstico de la tuberculosis. *Rev. Esp. Microb. Clin.* 4, 183-185.

Casal, M. (1990) Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y micobacteriosis). Bio Sell S.A., 22-53.

Casal, M. y Clemente, M.J. (1990) Interés clínico del estudio comparativo de la sensibilidad de la técnica de Ziehl-Neelsen con una nueva técnica diagnóstica en tuberculosis. *Arch Bronconeumol.* 26, 192-194.

Catty, D. and Raykundalia, C. (1988) ELISA and related enzyme immunoassays, en "Antibodies". *IRL Press.*, Oxford. 97-154

Chan, S.L., Reggiardo, Z., Daniel, T.M., Girling, D.J. and Mitchison, D.A. (1990) Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and hemagglutination assay with glycolipid antigens. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 385-390.

Chandramuki, A., Bothamley, G.H., Brenan, P.J. and Ivanyi, J. (1989) Levels of antibodies to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis* meningitis. *J. Clin. Microb.* **27**, 821-825.

Charpin, D., Herbault, H., Gevaudan, M.J., Saadjian, M., De, , Micco, P., Arnaud, A., Vervloet, D. and Charpin, J. (1990) Value of ELISA using A60 in thwe diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am.Rev. Respir. Dis.* **142**, 380-384.

Cheeseman, C.L., Wilesmith, J.W. and Stuart, F.A. (1989) Tuberculosis: the disease and its epidemiology in the badger, a review. *Epidem. Inf.* **103**, 113-125.

Cocito, C. and Vanlinden, F. (1986) Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Exp. Immunol.* **66**, 262-272.

Cocito, C., Baelden, M.C. and Benoit, C. (1987) Immunological properties of Antigen 60 of BCG. Induction of humoral and celular reaction. *Scand. J. Immunol.* **25**, 579-585.

Collins, C.H. (1982) Laboratory acquired tuberculosis. *Tubercle* **63**, 151.

Collins, D.M. and Stephens, D.M. (1991) Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS. Microbiol. Lett* **67**, 11-15.

Conville, P. and Witebsky, S. (1989) Inter-bottle transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **12**, 401-405.

Coppes, M.J., Olivieri, N.F., Howes, M., Pusic, M., Gold, R. and Richarson, S.E. (1992) Micobacterial brain abscess possibly due to bacille Calmette-Guerin in an immunocompromise child. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 662-665.

Corner, L.A., Barrett, R., Lepper, A.W., Lewis, V. and Pearson, C.W. (1981) A survey of micobacteriosis of feral pigs in the northern territory. *Aust. Vet. J.* **57**, 537-542.

Corner, L.A. and Trajstman, A.C. (1988) An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a descontaminant in the primary

isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions.. *Vet. Microbiol.* 18(2), 127-134.

Corner, L.A., John, M., Bundesen, P.G. and Wood, P.R. (1988) Identification of *Mycobacterium bovis* isolates using a monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.* 18(2), 191-196.

Corrêa, C.N.M. y Corrêa, W.M. (1974) Tuberculosis humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol. São Paulo* 41(3), 131-134.

Cousins, D.V., Francis, B.R. and Gow, B.L. (1989) Advantages of a new medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 20, 8995.

Cousins, D.V., Wilton, S.D. and Francis, B.R. (1991) Use of ADN amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 27(2), 187-195.

Cousins, D.V., Francis, B.R., Casey, R. and Mayberry, C. (1993) *Mycobacterium bovis* infection in a goat. *Aust. Vet. J.* 70(7), 262-263.

Cox, J.C., Drane, D.P., Jones, S.L., Ridge, S. and Milner, A.R. (1991) Development and evaluation of rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68, 157-160.

Cuezva, J. (1973) Epizootiología de la tuberculosis. *Trib. Vet.* 5, 3-4.

Cummins, C.S. (1962) Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomices* and *Arthrobacter*. *J. Gen. Microb.* 28, 35-50.

Daniel, T.M. and Anderson, P.A. (1977) The use of the immunosorbents for the purification of micobacterial antigens. *J. Lab. Clin. Med.* 90, 354-360.

Daniel, T.M. and Anderson, P.A. (1978) The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen "5". *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 533-539.

- Dannenberg, A. and Higuchi, S. (1979) Chronic inflammation involving cellular hypersensitivity. *Chest* 75, 265-266.
- Dannenberg, A. (1991) Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. today* 12, 228-233.
- Dannenberg, A. (1993) Inmunopatogenia de la tuberculosis pulmonar. *Hospital Practice* 8(6), 45-53.
- Davena, P. and Dabrigeon, J. (1955) La tuberculose de la chèvre à Saint-Étienne. *Rec. Med. Vet. D'Alfort* 131, 769-777.
- Dedie, K. (1973) Diagnóstico de la tuberculosis. *Trib. Vet.* 5, 3-4.
- De LaHaye, J. (1987) Tuberculose: un vide sanitaire. *La Chev.* 163, 10.
- Dowling, L.A. and Schleeauf, S.M. (1991) Specific antibody responses to *Mycobacterium bovis* in infected cattle analysed with six mycobacterial antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 50, 157-161.
- Ducan, A.L. (1990) Control sanitario de las explotaciones bovinas. *Vet. Rec. (Edición española)* 3, 180.
- Duffield, B.J., Norton, J.H. and Hoffmann, D. (1989) An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic from cattle in northern Queensland. *Aust. Vet. J.* 66, 307-308.
- Duffield, B.J. (1990) The development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 24, 205-209.
- Dufour, B. (1988) The livestock disease situation in Portugal. *GDS-Information Sanit.* 94, 31-30.
- Dufour, B. (1989) The animal disease situation in Italy. *GDS-Information Sanit.* 97, 26-41.
- Dulin, M.P. A review of tuberculosis (micobacteriosis) in fish. *Exot. Pract.* 4, 731-735.

Du Moulin, G.C. and Stottmeier, K.D. Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. *Feat.* 52, 525-527.

Eckdal, M.O., Smith, B.L. and Money, D.F.L. (1970) Tuberculosis in some wild and feral animals in New Zealand. *New Zealand Vet. J.* 18, 44-45.

Edington, J. (1989) Tuberculosis in a South Canterbury goat flock. *Surveill.* 16(1), 22-23.

Engvall, E. and Perlmann, P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA. III. Quantification of antibodies by enzyme-linked in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-135.

Espitia, C., Cerera, I., González, R. and Mancilla, R. (1989) *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin. Exp. Immunol.* 77, 373-377.

Fadda, G., Grillo, R., Ginesu, F., Santoru, L., Zanetti, S. and Dettori, G. (1992) Serodiagnosis and follow up of patients with pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur. J. Epidemiol.* 8, 81-87.

Fanning, A. and Edwards, S. (1991) *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *Lancet (British Edition)* 338(8777), 1253-1255.

Farina, M., Marmo, G., Moriconi, E., Surico, L. and Vittone, L. (1988) Importanza sociale della diagnosi tubercolinica della specie bovina. *Archiv. Veter. Ital.* 39, 185.

Fifis, T., Plackett, P., Corner, A. and Wood, P.R. (1989) Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scan. J. Immun.* 29, 91-101.

Fifis, T., Costopoulos, C., Radford, A.J. and Wood, P.R. (1991) Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect. Immunol.* 59, 800-807.

Fillet, R. (1989) Un cas de transmission interespecificque de tuberculose. *Colloque International de NIORT, France.*

Flamand, J.R.B., Greth, A. and Griffin, F. (1994) An outbreak of tuberculosis in captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*):

- diagnosis and monitoring. *Vet. Rec.* 134, 115-118.
- Fleetwood, A.J., Stuart, F.A., Bode, R. and Sutton, J.P. (1988) Tuberculosis in deer. *Vet. Rec.* 123, 279-280.
- Francis, J. (1947) Bovine tuberculosis. *London: Staples Press.* 87-95.
- Francis, J. (1858) Tuberculosis in animals and man. *Cassell and Company, Ltd, London (England).*
- Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, I.W.O., Boyle, D., Lumsden, M.J. and Frost, A.J. (1978) The sensitivity and specificity of various tuberculin test using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103, 420-435.
- Frank, J., Griffin, T. and Cross, J.P. (1989) Diagnosis of tuberculosis in New Zealand farmed an evaluation of intradermal skin testing and laboratory techniques. *Irish Vet. J.* 42(11/12), 101-107.
- Fuente, O. (1987) Tuberculosis caprina: Aislamiento de *M. tuberculosis*, variedad bovis y avium de cabras naturalmente infectadas. *XII Jornadas Científicas de SEOC, Guadalajara, 12-13-14 de Noviembre* volume, 49-65.
- Garai, D. and Som, T.L. (1992) Studies on the pathology of lymph nodes in goats. *Ind. Vet. Med. J.* 16, 268-270.
- García, F.L., Carvajal, R.E. and Hernández, R. (1991) Enzyme immunoassay using BCG in serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J. Hyg. Camb.* 97, 483-487.
- García-Carreño, F.L., Carvajal, R.E. and Hernández, R. (1986) Enzyme immunoassay using BCG in serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J. Hyg. Camb.* 97, 483-487.
- García-Rodríguez, J.A., Martín, F., Sánchez, M.C. and Marrero, M. (1975) Isolement de mycobactéries atypiques à partir de ganglios bovins et porcins présumés sains. *Rev. Epidem. Med. Soc. et Santé Publ.* 23, 269-276.
- Gillespie, J. and Timoney, J. (1983) El género *Mycobacterium*, en "Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos". Eds. Gillespie, J. and Timoney, J. *La Prensa Médica Mexicana, Mexico.*

4ª Edición. 228-261

Gilmour, N.J. and Gyuris, A. (1972) *Corynebacterium renale* as a cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease. *J. Comp. Pathol.* **82**, 333-336.

Gómez, J.C., Carrasco, L., Méndez, A., Mozos, E. y Navarro, J. (1987) Meningoencefalitis tuberculosa en ternero. *Vet. Prax.* **2**, 45-46.

Gómez, M.A., Menchen, V., Navarro, J.A., Sanchez, J., Gómez, S., Torreblanca, P. y Bernabé, A. (1992) La tuberculosis abierta caprina como factor de riesgo en el contagio interespecífico. *Cienc. Vet.* **5**, 59-62.

Goodfellow, M. and Minnikin, D.E. (1984) Circumscription of the genus, in "The mycobacteria". Eds. Kubica, G.P. and Wayne, L.G. Ed. *Marcel Dekker Inc.*, New York. 1

Goodger, J., Nolan, A., Russell W.P., Dalley D.J., Thorns C.J., Stuart, F.A., Croston, P., Newell, D.G. (1994) Serodiagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in badgers: development of an indirect ELISA using 25 kDa antigen. *Vet. Rec.* **135**, 82-85.

Goren, M.B. (1982) Immunoreactive substance of mycobacteria. *Rev. Respir. Dis.* **125**, 50.

Grange, J.M., Collins, C.M. and McSwiggan, D. (1976) Bacteriophage typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in south East England. *Tuberc.* **57**, 59-66.

Grange, J.M. and Collins, C.H. (1987) Bovine tubercle bacilli and disease in animals and man. *Epidem. inf.* **92**, 221-234.

Grange, J.M., Collins, J.D.O., Reilly, L.M., Costelo, E. and Yates, M.D. (1990) Identification and characteristics of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle, badgers and deer in the Republic of Ireland. *Irish Vet. J.* **43(2)**, 33-35.

Grasser, A. and Grasser, R. (1986) The calibration, control and use of a diluted bovine tuberculin (PPD) for testing cattle in areas free of tuberculosis. *Dev. Biol. Stand.* **58**, 683.

Griffing, J.F.T., Nagai, S. and Buchan, G.S. (1991) Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified derivative and specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. *Res. Vet. Sci.* **50**, 279-285.

Griffith, S.A. (1913) Human tubercle bacilli in the milk of a vaccinated cow. *J. Path. Bac.* **17**, 323-328.

Gunnarsson, E. and Fodstad, F.H. (1979) Analysis of antigens in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Act. Vet. Scand.* **20**, 200-215.

Gunn, D.A. and Jenkins, P.A. (1994) Tuberculosis in cats. *Vet. Rec.* **134**, 395.

Gutiérrez, J. y Bojalil, L. (1953) Determinación de la velocidad de crecimiento de *M.tuberculosis* y algunas de sus aplicaciones. *Rev. Mej. Tub.* **15**, 1-8.

Gutiérrez, J.M. (1958) Los medios de agar cabón, agar sangre y Löwenstein-Jensen Holm en el cultivo de *M.tuberculosis*. Estudio comparativo por el medio de diluciones seriadas. *Lat. Mic.* **1**, 125-136.

Gutiérrez, M.M., García, J.F., Cancela, M.M.G. y Marín, J.F.G. (1993) Comparison of Zielhi-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *J. Comp. Path.* **109(4)**, 361-370.

Haagsma, J. (1986) Potency testing of the bovine tuberculins. *Dev. Biol. Stand.* **58**, 689.

Hall, M.R. and Thoen, C.O. (1983) Lymphocyte immunostimulation responses following intravenous injection of *Mycobacterium bovis* PPD tuberculin in cattle experimentally exposed to *Mycobacterium bovis*. *Proc. Annu Meet. Am Assoc. Vet. Lab. Diagn.* **29**, 51-62.

Hall, M.R. and Thoen, C.O. (1986) Use of sodium deoxycholate to extract cell wall components of virulent *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 2572-2576.

Hanna, J., Neill, S.D.O. and Brien, J.J. (1989) Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* **47(1)**, 43-47.

- Harboe, M. and Nagai, S. (1984) MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am. Rev. respir. Dis.* 129, 444-452.
- Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M.E., Torres, M.L., Ramirez, C. and Cruz, N. (1986) Properties of proteins MPB64, MPB70 and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 52, 293-302.
- Harboe, M., Wiker, H.G., Duncan, J.R., Garcia, M., m, , Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C. and Nagai, S. (1990) Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for antiMPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28(5), 913-921.
- Harlow, D. and Lane (1988) Electrophoresis. SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. Apendix (I) Antibodies. A laboratory manual. *Ed. Harlow, D. and Lane.* 636.
- Heijlicek, K., Vítovec, J. and Vladik, P. (1973) Bovinni Tuberkulóza u Norkū. *Vet. Med.* 18, 707-716.
- Hermoso, J. y Cardenal, J. (1992) Etiología de la tuberculosis bovina. *Bovis* 47, 11-20.
- Hernández, J. y Dubón, F. (1992) Las Micobacterias, en "Sistemática Bacteriana". Eds. Hernández, J. and Dubón, F. *Copión S.L.* 3ª Edición, Valencia. 16.1-16.13
- Hewinson, R.G. and Russell, W.P. (1993) Processing and secretion by *Eschericia coli* of a recombinant form of the immunogenic MPB70 of *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1253-1259.
- Hewson, P.I. and Simpson, W.J. (1987) Tuberculosis infection in cattle and badgers in an area of Staffordshire. *Vet. Rec.* 120, 252-256.
- Hirai, Y. (1991) Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J. Hosp. Infect.* 19, 191-200.
- Hoffner, S.E., Hahn, K., Pedersen, A. and Sandstedt, K. (1989) Rapid radiometric detection of mycobacterial growth from smear-positive tissue samples from pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 65-67.
- Hubbard, R.D., Flory, C.M., Collins, F.M. and Cocito, C. (1992) Immunization of mice with the antigen A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Exp. immunol.* 88, 129-131.

Instituto de salud Carlos III, (1990) Infecciones por micobacterias notificadas al sistema de información microbiológica. *Boletín Epidemiológico Semanal*, Madrid, 28 de Enero al 10 de Febrero, N° 1853 30-40.

Jandel Scientific (1989-90) Table Curve. Versión 2.11. *AISN Software*. Registration numer 481385

Jiménez, C., Valdivia, J. and Mazon, D. (1989) Phage typing of *Mycobacterium tuberculosis* in Cuba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 84, 271.

Johnson, C.T., Winkler, C.E., Boughton, E. and Penfold, J.W.F. (1993) *Mycobacterium kansasii* infection in llama. *Vet. Rec.* 133, 243-244.

Jorgensen, J.B. (1981) Pathogenicity and immunogenicity of atypical mycobacteria for calves: a short summary. *Rev. Infect. Dis.* 3(5), 979-980.

Joubert, L. (1973) Profilaxis y tratamiento de la tuberculosis. *Trib. Vet.* 5, 3-4.

Jubb, K.V., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (1985) Tuberculosis in cattle, in "Pathology of Domestic Animals". Eds. Jubb, K.V., Kennedy, P.C. and Palmer, N. *Academic Press Inc.*, London. 443-504.

Kantor, I.N., Nader, A., Bernardelli, A., Girón, D.O. and Man, E. (1987) Tuberculous Infection in cattle not detected by Slaughterhouse Inspection. *J. Vet. Med* 34, 202-205.

Kato, M. and Goren, M.B. (1974) Synergistic action of cord factor and mycobacterial sulfatides on mitochondria. *Infect. Immun.* 10, 325.

Köbel, H.K. (1984) Electron microscopy, in "The mycobacteria". A source book. Parts A y B, Eds. Kubica, G.P. and Wayne, L.G. *Marcel Dekker*, New York. 249.

Kleeberg, H.H. (1975) Tuberculosis and other Mycobacteriosis, in "Diseases transmitted from Animals to man". Eds. Hubbert, W.T., McCulloch, W.F. and Schnurrenberger, D.R. *Springfield II*. 303-360

Kleeberg, H.H. (1988) Experimental evaluation of chemoprophylaxis of tuberculosis and preventive treatment in animals, in "Antituberculosis drugs". Bartman K., *Springer-Verlag*, Berlín. 233

Kubin, M., Heralt, Z., Morongoya, I., Ruzhova, R. and Viznerova, A. (1984) Two Cases of Probable Man to Man Transmission of *Mycobacterium bovis*. *Z. Erkrank. Atm. Org.* 163, 285-291.

Kuchinka, G.D., Thoen, C.O. and Volker, M. (1990) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to the neotype strain of *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 1990, 1608-1615.

Langenegger, J., Cavalcante, M.L. and Lira, A.D. (1991) Mass treatment of tuberculosis cattle with isoniazid. *Pes. Vet. Brasil.* 11(1-2), 21-23.

Lansdell, W., Dixon, N., Smith, N., Benjamin L. Isolation of several *Mycobacterium* species from fish. *J. Aqu. Anim. Heal.* 5, 73-76.

Lederer, E. (1984) Chemistry of mycobacterial cord factor and related natural and syntetic trehalose ester, in "The Mycobacteria". Eds. Kubica, G.P. and Wayne, L.G. *Marcel Dekker Inc.*, New York. 361.

León, L. (1985) Patología y control de las infecciones animales por corinebacterias. *IX Congreso Nacional de Microbiología*, Valladolid, 411-416.

Lepper, A.W.D. and Pearson, C.W. (1975) The indirect fluorescent antibodies in bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 51, 256-261.

Lepper, A.W.D., Corner, L.A., Pearson, C.W. and Catherine, W. (1977) Serological response in experimental bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 53, 301-305.

Lepper, A.W. and Corner, L.A.. (1983) Naturally occurring mycobacterioses of animals, in "The Biology of the Mycobacteria". Eds. Ratledge, C. and Stanford, L. *Academic Press*, London. 417

Lesslie, L.W., Ford, E. and Linzell, J. (1960) Tuberculosis in goats caused by the Avian type tubercle bacillus. *Vet. Rec.* 22, 1990.

Lesslie, I.W. (1968) Cross infections with mycobacteria between animals and man. *Bull. Inter. Union Against Tub.* 41, 285.

- Li, Q. (1991) Production and characterization of 3 mcAbs to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chung. Hua. Chieh. Ho. Ho. Hu. Hsi. Tsa. Chih.* 14, 197-198.
- Libonati, J.P., Hooper, N.M., Carter, M.E. and Siddiqi, S.H. (1986) Evaluation of the recovery and contamination rates of mycobacteria in the BACTEC system using increased media volume increased inoculum and new antimicrobial suplement (PANTA). Abstrac U37, ASM. Ann. Meet. Wash. D.C. Amer. Soc. Microbiol.
- Lind, A.Y. and Zhu, S.Z. (1991) 301 cases with bronchial asthma treated by Kahusu. *Chung. Hsi. I. Chieh. Ho. Tsa. Chih.* 11, 209-211.
- López, J.L., Argüello A., Capote, J.F. y Fabelo F. (1992) Aproximación a la estructura de la explotación caprina en Canarias. I Curso sobre producción y patología caprina. *Ed Castañón. J.I.R., Gutierrez, C, Morales, M.* ISBN:84-7996-011-6.1-17
- Lordi, G.M. and Retchman, L.B. (1988) Tuberculin skin testing. *Scholseberg, New York.* 33-8
- Lu, Y.S., Tsai, H.J., Tsung, C.S., Chen, C.C., Lee, H.L., Hung, H.H. and Lee, S.H. (1992) Goat tuberculosis in Taiwan. *Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Health.* 59, 61-68.
- Luke, D. (1958) Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. *Vet. Rec.* 70, 529-536.
- Lurie, M.B. (1964) Resitance to tuberculosis: experimental studies in native and adquired defensive mechanimis. *Harvard University Press.*
- Mahmood, K.H., Rook, G.A. and Stanford, J.L. (1987) The immunological consequences of challenge with bovine tubercle bacilli in badgers (*Meles meles*). *Epidem. Inf.* 98, 155-163.
- Mahmood, K.H., Stanford, J.L. and Rook, A.W. (1987) The immunoresponse in two populations of wild badgers naturally infected with bovine tubercle bacilli. *Tubercle* 68, 119-125.
- Martín, F. (1983) Criterios actuales de clasificación del género *Nocardia*. *IX Congreso Nacional de Microbiología, Valladolid, 2,* 395-400.

Martin, S.W., Meek, A.H., Willeerg, P.W. (1987) Measurement of disease frequency and productions. In *Veterinary epidemiology. Principles and methods. Iowa State University Press* 74-75.

Martín, F. y Valero, P. (1986) Chromatographic analysis in mycobacteria taxonomy and identification, in "Mycobacterial of clinical interest". Eds. Casal, M. *Excerta Medica*, Oxford. 264-270

Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamasaki, A., Terasaka, K. and Nagai, S. (1991) Study on recombinant BCG. *Kekkaku*. 66, 615-619.

Matthias, D. (1987) Infecciones por micobacterias, en "Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos". Eds. Beer, J. *Acribia*, Zaragoza. 229-252.

McFadden, J.J. and Houdayer, C. (1988) No evidence for antibodies to mitochondrial A60 antigen in Crohn's disease sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Med. J.* 25, 295-298.

McKenzie, P.D. and Ward, W.H. (1981) *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*: A possible cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease of cattle. *Aust. Vet. J.* 57, 200-201.

McNeil, M., Daffe, M. and Brennan, P. (1990) Evidence for nature of the link between the Arabinogalactan and Peptidoglycan of Mycobacterial cell walls. *J. Biol. Chem.* 265, 18200-18206.

Meissner, G. (1973) Etiología de la tuberculosis. *Trib. Vet.* 5, 3-4.

Milne, A.H. (1955) An outbreak of tuberculosis in goats in Tanganyika. *The Veterinary Record* May 14th, 374-375.

Ministry of Agriculture Fisheries and Food (1983) Letter from J.C. Dring to M.Carwardine. *London* 22nd. December.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1987) Chief Veterinary Officer annual report 1986. *Animal Health Division. Wellington, New Zealand*, 35.

Ministry of Agriculture Fisheries and Food (1994) MAFF reports increase in bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 135, 170-171.

- Miura, K., Nagai, S., Kinomoto, M., Haga, S. and Tokunaga, T. (1983) Comparative studies with various subtrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an Antigenic protein, MPB70. *Infec. Immun.* 39, 540-545.
- Molina, A., Morera, L. y Llanes, D. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goat. *Am. J. Vet. Res* 6, 863-968.
- Molina, J.M. (1992) Aportaciones al diagnóstico inmunológico de la paratuberculosis caprina. *Tesis doctoral*. Córdoba.
- Mukherjee, S., Som, T.L. and Basak, D.K. (1988) Tuberculosis in goat: A case report. *Indian J. Vet. Path.* 12, 91-93.
- Mukherjee, J., Deb, P. and Pal, B. (1992) Studies on histopathology of tubercular nephritis in goat (*Capra hircus*). *Indian Vet. J.* 69, 562.
- Müller, G. (1987) Infecciones por micobacterias, en "Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos". Eds. Beer, J. *Acribia*, Zaragoza. 34.
- Nagai, S., Matsumoto, J. and Nagasuga, T. (1981) Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. immunol.* 31, 1152-1160.
- Nain, S.P.S., Chandiramani, N.K., Kulshreshtha, R.C. and Chugh, S.K. (1985) Studies on tuberculin and johnin reactors a preliminary report. *Indian Vet. J.* 62(8), 643-646.
- Nair, M.E., Robertson, J.P. and McQuade, N.C. (1982) The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. *Proc. Meet. Goat. Prod. Dis.* 3, 455-457.
- Nassau, E., Parsons, E.R. and Johnson, G.D. (1976) The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tuberc.* 57, 67-70.
- Navarro, J.A., Bernabé, A., Gómez, M.A., Sánchez, J. y Gómez, S. (1990) Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. *J. Vet. Sci. Serie B.* (en prensa).

Neill, S.D., O'Brien, J.J. and McCracken, R.M. (1988) *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet. Rec* 122, 184-186.

Neill, S.D., Hanna, J.O., Brien, J.J. and McCracken, R.M. (1989) Trasmision of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *Vet. Rec.* 124, 269.

Neill, S.D.O., Brien, J.J. and Hanna, J. (1991) A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous. *Vet. Microbiol.* 28(1), 103-109.

Neill, S.D., Hanna, J., Mackie, D.P. and Bryson, T.G. (1992) Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet. Rec.* 131, 45-47.

Neill, S.D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D.P., Pollock, J., Clements, A., Walton, E. and Bryson, D.G. (1994) Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet. Rec.* 135, 134-135.

Office International des Epizooties (1986) Norway. Animal health status an methods of control of animal diseases 1985. *12th Conference of the OIE Regional Commision for Europe, Berlin, 16-19 September*, 359-361.

Okolo, M.I. (1992) Tuberculosis in apparently healthy milch cows. *Microbios.* 69, 105-111.

Oliveira, S.J., Pianta, C., Ramaos, E.T., Prate, C.A., Barbosa, C.A. and Silva, F.M. (1983) Salud publica veterinaria. Un estudio sobre tuberculosis en ganado lechero. *Bol. Sanin. Panam.* 94, 142-149.

O'Reilly, L.M. (1986) Field trials to determine a suitable injection dose of bovine PPD tuberculin for the diagnosis in naturally infected cattle. *Dev. Biol. Stand.* 58, 695.

Ortega, A. y March, J. (1979) Manual de técnicas en microbiología. *Centro Nacional de Microbiología de Majalahonda, Madrid.* 11-15.

Ortega, A. y March, J. (1982) Observaciones sobre el medio de cultivo para el aislamiento de micobacterias.. *Monografías Instituto Llorent Madrid.*

- Ortega, A. y March, J. (1989) Estudio comparativo de tres medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias de muestras clínicas. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 4, 720-723.
- Ovdienko, N.P., Naimanov, A., Plotnikov, E., Yakusheva, O.V., Kadochkin, A.M., Zemlyanova, V.E., Piontkovskii, V.I., Bakhtin, D.P., Dobovoi, I.S. and Kavun, I.S. (1989) Comparison of mammalian tuberculin prepared in USSR and in other countries. *Vet. (Moskva)* 10, 21-24.
- Pallaske, G. (1961) Pathologische anatomie und pathogenese der spontanen tuberkulose der tiere. *Fischer*, Stuttgart.
- Papa, F., Cruaud, P. and David, H.L. (1989) Antigenicity and specificity of selected glycolipid fractions from *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 140, 569-578.
- Pavlas, M. (1990) Thermoresistance mycobacterial. *Vet. Brno* 59(1-2), 65-71.
- Perrin, G., Savey, M. and Baradat, E. (1984) La tuberculose de la chèvre: identification et controle. *Le Point Vet.* 16, 59-63.
- Pier, A.C., Thurston, J.R. and Larsen, A.B. (1968) A diagnostic antigen for nocardiosis: Comparative test in cattle with nocardiosis and mycobacteriosis. *Am. J. Vet. Res.* 29, 397-403.
- Pina, J.M., Martín, A., Gonzalez, P., López, J.L. y Miret, P. (1989) La prueba de la tuberculina. *Med. Int.* 13, 330-344.
- Pina, J.M. (1992) Intradermorreacción tuberculínica, en "Actualización en tuberculosis". Eds. *Camínero, J.A.* Madrid. (en prensa).
- Pittler, H. and Batza, H.J. (1988) The animal disease situation in the German Federal Republic 1987. *Tier. Ums.* 43(5), 294-298.
- Plackett, P., Ripper, J., Corner, L.A., Small, K., Witte, K., Melville, L., Hides, S. and Wood, P.R. (1989) An ELISA for detection of Anergic tuberculous cattle. *Aust. Vet. J.* 66, 15-19.
- Radford, A.J., Duffield, B.J. and Plackett, P. (1988) Cloning of Species-Specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infec. Immun.* 56, 921-925.

Radhakrishnana, V.V. and Mathai, A. (1991) A dot-immunobinding assay for the laboratory diagnosis of tuberculous meningitis and its comparison with enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 428-433.

Radhakrishnan, V.V., Mathai, A., Radhakrishnan, N.S., Rout, D. and Sehgal, S. (1991) Immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens in intracranial tuberculoma. *Indian. J. Exp. Biol.* 29, 641-644.

Rado, T.A., Bates, J.H., Engel, H.W., Mankiewicz, E., Murohashi, T., Mizuguchi, Y. and Sula, L. (1975) World Health Organization studies on bacteriophage typing of mycobacteria. Subdivision of the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 11, 459-468.

Randuz B.L. and Lepper A.W.D. (1985) Suppression of skin reacti-vits to bovine tuberculin in repeat test. *Aust. Vet.* 191, 194.

Real, F. y Gasca, A., (1985) *Mycobacterium chelonae* in positive-tuberculine bovines. *Intern. Symp. Mycob. Clin. Int. Spain.* 27-28 Sept., 72.

Real, F. y León, L. (1990) Respuesta humoral de la oveja segureña frente a la prevención de la seudotuberculosis (por *Corynebacterium pseudotuberculosis*) *Med. Vet.* 8, 25-30

Real, F., León, L., Acosta, ., Ferrer, O., Gutierrez, C. y Déniz, S. (1993) Seudotuberculosis caprina: descripción de una nueva forma cíclica de la enfermedad. *AYMA* 33(6) 177-179

Reggiardo, Z. and Middlebrook, G. (1975) Serologically active glycolipid families from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Extraction, purification and immunologic studie. *Am. J. Epidemiol.* 100, 469-476.

Ridell, M. (1977) Studies on corynebacterial precipitinogens common to *Mycobacterium* , *Nocardia*, and *Rhodococcus*. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.* 55, 468-475.

Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., Collins, M.T., Condrón, R.J., Skilbeck, N.W. and Webber, J.J. (1991) Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68, 253-257.

- Ritacco, V., López, B., Barrera, L., Nader, A., Fliess, E. and Kantor, I. (1990) Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Zent. Vet.* 37, 19.
- Rivas, M., Luengo, J., Luengo, M., Arata, N. y Velásquez, G. (1985) Finding of the primary complex at the level of the retropharyngeal lymph glands in the bovine. *Agr. Cienc.* 1(1), 91-92.
- Robintson, P., Morris, P. and Antic, R. (1988) *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. *Aust. J. Med.* 18, 701.
- Robinson, R.C., Philips, P.H., Stevens, G. and Storm, P.A. (1989) An outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in fallow deer (*Dama dama*). *Aust. Vet. J.* 66(7), 195-197.
- Rodríguez, M.D., Real, F. y Gasca, A. (1983) Estudio de la tuberculosis bovina en la provincia de Córdoba. *Hyg. Pec.* 5, 31-57.
- Rodríguez, J., Ramos, F. y Eguíluz, J. (1989) Saneamiento caprino en Navarra. *Nav. Agr.* 33-38.
- Rosenberger, G. (1983) Tuberculosis, in "Enfermedades de los bovinos". Tomo II. Eds. Rosenberger, G. *Hemisferio Sur SA*, Argentina. 139-151
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C. and Wood, P.R. (1990) A enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67, 134-137.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C. and Wood, P.R. (1990) A sandwich enzyme immunosorbent for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67(4), 134-137.
- Rousseau, P. and Duptuis, M. (1990) Antituberculous drug susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* BCG strain Montreal. *Can. J. Microbiol.* 36(10), 735-737.
- Runyon, E.H., Wayne, L.G. and Kubica, G.P. (1974) The *Mycobacterium Lemann and Neumann*, in "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Eds. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. *The Williams*

and Wilkins Co., Baltimore. 681

Ruppert, E. (1992) Meat hygiene statistics 1990. *Rund. Fleisch. Lebens. (RFL)* 44(10), 226-228.

Sánchez, J.M. y Cambra M. (1987) Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. *Ed Oficina Internacional de epizootias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie técnica nº 7* 4 y 11-29.

Sanson, R.L. (1988) Tuberculosis in goats. *Surveill.* 15(2), 7-8.

Schawbe, C.W. (1984) In "Veterinari Medicine and human health". *Williams and Wilkins*, Baltimore.

Schliesser, and Th, (1973) Patogénia , patología y curso de la tuberculosis. *Trib. Vet.* 5, 3-4.

Schöning, R., Verstijnen, C.P.H.J., Kuijper, S. and Kolk, A.H.J. (1990) Enzyme immunosorbent assay for identification of heat-killed mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes and derived from early cultures. *J. Clin. Microbiol.* 28, 708-713.

Sharan, A., Thakur, H., Prasad, L., Mukherjee, G. and Sinha, A. (1988) A note on tuberculosis in goats. *Indian Vet. Med. J.* 12, 184-186.

Sharma, R.N., Francis, B.K.T., Pandey, G.S. and Chizyuka, H.G.B. (1985) Goat tuberculosis in Zambia. *Indian J. Vet. Path.* 9, 29-32.

Sharov, A.N. (1986) Intrapalpebral tuberculin test for sheep and goats. *Veterinariya, Moscow* 8, 44-46.

Siddiqu, S.H., Hwangbo, C.C., Silcox, V., Good, R.C., Snider, D.E. and Middlebrook, G. (1984) Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis/M. bovis* from other mycobacterial species. *Am. Rev. Respir. Diss.* 130, 634-640.

Sills, R.C., Mullaney, T.P., Stickle, T.P., Darien, B.J. and Brown, C.M. (1990) Bilateral granulomatous gutural pouch infection due to *Mycobacterium avium* complex in a horse. *Vet. Path.* 27, 133-135.

Sioud, M., Kjeldsen, K., Quqyle, A.J., Wiker, H.G., Sorskaar, D., Natvig, J.B. and Forre, O. (1991) Immuno responses to 18.6 and 30-kDa mycobacterial antigens in rheumatoid patients, and V beta usage by specific synovial T-cell lines and fresh T cell. *Scand. J. Immunol.* **34**, 803-812.

Siposova, E., Schwartz, E., Micieta, I. and Turzova, M. (1990) Use of ELISA for the determination of IgG antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in diagnosis of tuberculosis. *Bratisl. Lek. Listy.* **91**, 125-130.

Skamene, E. (1991) Population and molecular genetics of susceptibility to tuberculosis. *Cli. Invest. Med.* **14(2)**, 160-166.

Sánchez, C. (1971) Patología y clínica del ganado bovino. *Not. Neosán.* **161**.

Soliman, K.N., Rollinson, D.H.L., Barron, N.S. and Spratling, F.R. (1953) An Outbreak of naturally acquired tuberculosis goats. *The Veterinary Record* **65**, 421-425.

Som, T.L. and Bhattacharyya, H.M. (1987) Lymphadenitis in sheep and goats. *Indian Vet. Med. J.* **11(4)**, 227-230.

Spangler, E., Heider, L.E. and Bech-Nielse, S. (1991) Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am. J. Vet. Res.* **8**, 1197-1200.

Stanford, J.L. and Grange, J.M. (1974) The meaning and structure of species as applied to mycobacteria. *Tuber.* **55**, 143.

Steigler, H. (1985) Results of official slaughter animal and meat. Inspection 1983. German Federal. *Fleisch.* **65**, 496.

Steigler, H. (1986) Results of official inspection of slaughter animals and meat during 1984. *Fleisch.* **66(8)**, 1254.

Strumpf, I.J., Tsang, A.Y. and Sagre, J.W. (1979) Reevaluation of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *AM. Rev. Respir. Dis.* **119**, 599-602.

Stuart, F.G.A. (1988) Tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*), en "Management and helth of farmed deer". *Current*

Topics in Veterinary Medicine 48. Sem. Comm. Eur. Comm. Prog. Coord. Res. Anim. Husb. Held. Edinburg, Diciembre, 101-111.

Suther, D.E., Franti, C.E. and Page, H.H. (1974) Evaluation of a comparative Intradermal Tuberculin Test in California dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* **35**, 379-387.

Takayama, K. and Qureshi, N. (1984) Structure and synthesis of lipids, in "The Mycobacteria". Eds. Kubica, G.P. and Wayne, L.G. *Marcel Dekker Inc.*, New York. 315

Tapparelli, F. and Marzadori, F. (1990) Observations on two outbreaks of tuberculosis in pigs at slaughter. *Sel. Vet.* **31(9)**, 1133-1135.

Taquet, A. and Tison, F. (1961) Nouvelle technique d'isolement des mycobacteries par le lauryl-sulfate de sodium. *Ann. Inst. Past.* **100**, 676-680.

Tarshis, (1953) Blood medium for de cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Clin. Path.* **23**, 661-670.

Teplizki, H., Buskila, D., Alkan, M., Coates, A.R.M., Baumgarten, A. and Schoenfeld, Y. (1987) ELISA measurement of antibody titer to purified protein derivative and mycobacteria-derived phosphoglycolipids: tool for diagnosis active pulmonary tuberculosis. *Isr. J. Med. Sci.* **23**, 1121-1124.

Terpstra, W.J. (1990) Métodos basados en los ácidos nucleicos para la detección de micobacterias. *Bol. Un. Inter. Tuberc.* **65**, 70-73.

Thoen, C.O., Jarnagin, J.L. and Richards, W.D. (1975) Isolation and identification of mycobacteria from porcine tissues. *Am. J. Vet. res.* **36**, 1383-1386.

Thoen, C., Himes, E., Stumpff, C., Parks, T. and Sturkie, H. (1977) Isolation of *Mycobacterium bovis* from the prepuce of a herd *Bull. Am. J. Vet. Res.* **38**, 877-878.

Thoen, C.O. and Karlson, A.G. (1978) The genus *Mycobacterium*, in "Veterinary Microbiology". Eds. Packer, R.A., Maré, C.J. and Merchant, L.A. *Iowa States University Press Ames, Iowa.* 263.

- Thoen, C.O., Himes, E.M., Richards, W.D., Jarnagin, J.L. and Harrington, R. (1979) Bovine tuberculosis in the United States and Puerto Rico: A laboratory Summary. *Am. J. Vet. Res.* 40, 118-120.
- Thoen, C.O., Kalson, A.G. and Himes, E.M. (1981) Mycobacterial Infections in animals. *Rev. Infect. Dis.* 3, 960.
- Thoen, C.O., Hall, M.R. and Petersburg, T.A. (1983) Application of a modified enzyme-linked immunosorbent assay for detecting mycobacterial antibodies in sera of cattle from a herd in which *Mycobacterium bovis* infection was diagnosed. *Proc. Annu. Meet.* 87, 603-610.
- Thoen, C.O., Karlson, A.G. and Himes, E.M. (1984) *Mycobacterium tuberculosis complex*, in "The Mycobacteria". *Marcel Dekker*, New York. 1209
- Thoen, C.O. (1988) Tuberculosis. *J.A.V.M.A.* 193, 1045.
- Thoen, C.O. and Himes, E.M. (1988) Mycobacterium, in "Pathogenesis of Bacterial infections in animals". Eds. Gyles, C.L. and Thoen, C.O. *University Press, Ames, Iowa State.* 26-37
- Thoen, C.O., Thorlson, K., Miller, L., Himes, E. and Morgan, R. (1988) Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in American bison. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1861-1865.
- Thongkrajai, P., Lulitanon, V. and Chamnanvanakit, C. (1989) Improved ELISA with immunosorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J. Med. Microbiol.* 30, 101-104.
- Thorel, M.F. and Gaumont, R. (1977) Contribution à l'étude des réactions sérologiques et allergiques chez la chèvre sensibilisée par des antigènes tuberculeux. *Bull. Acad. Vet. de France* 50, 549-568.
- Thorel, M.F. (1980) Tuberculose de la chèvre: Diagnostic biologique. *Ann. Rech. Vet.* 11, 251-257.
- Thorel, M.F. (1984) Tuberculose de la chèvre. Mise au point et synthèse. *Coll. INRA* 28, 551-557.
- Thorns, C.J. and Morris, J.A. (1986) Shared epitopes between mycobacteria and other microorganisms. *Res. in Vet. Sci.* 41, 275-276.

- Thrusfield, M. En "Epidemiología veterinaria". *Acribia*. Zaragoza. 42-44 y 191-197.
- Tizard, I. (1987) En "Inmunología Veterinaria". *Interamericana*. 3ª Edición, Mejico. 334-342
- Truant, J.P., Brett, W.A. and Thomas, W. (1962) Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* 10, 287.
- Valero, P. y Martín, F. (1987) Cromatografía de capa fina y cromatografía de gases en la identificación de micobacterias de interés clínico. *Enf. Inf. y Microbiol. Clin.* 5(6), 67-70.
- Veerman, G.M., Pike, J.G. and Fox, J.L. (1986) Use of modified 7H-11 agar to increase growth rate of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues. *Aust. Vet. J.* 63(10), 348.
- Veerman, G.M., Kelman, R., Colley, J. and pike, J.G. (1990) Rapid Confirmatory Identification of *Mycobacterium bovis* using a Dot Blotting Immunodetection Technique. *Vet. Microbiol.* 22, 335-340.
- Vera, A., Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Menchen, V. y Sidrach, J. (1989) A case of tuberculosis in goat produced by *Mycobacterium tuberculosis*. *II Coll. Intern. NIORT*, France.
- Viallier, J., Viallier, G., Prave, M. and Joubert, L. (1983) Place of *Mycobacterium avium* in the current epidemiology of *Mycobacterium* infections in domestic and wild animals. *Sci. Vet. Med. Comp.* 85(2), 103-108.
- Wayne, L.G., Engbaek, H.C., Engel, H.W.B., Froman, S., Gross, W., Hawkins, J., Kämpfer, W., Karlson, A.G., Kleeberg, H.H., Krasnow, I., Kubica, G.P., McDurmont, C., Nel, E.E., Pattyn, S.R., Schröder, K.H., Showalter, S., Tarnok, I., Tsukamura, M., Vergmann, B. and Wolinsky, E. (1974) Highly Reproducible Techniques for Use in Systematic Bacteriology in the Genus *Mycobacterium*: Test for Pigment, Urease, Resistance to Sodium Chloride Hydrolysis of Tween 80 and B-Galactosidase. *Int. J. Syst. Bact.* 24(4), 412-419.
- Wayne, L.G., Engel, H.W.B., Grassi, C., Gross, W., Hawkins, J., Jenkins, P.A., Kämpfer, W., Kleeberg, H.H., Krasnow, I., Nel, E.E., Pattyn, S.R., Richards, P.A., Showalter, S., Slosarek, M., Szabo, I., Tarnok, I., Tsukamura, M., Vergmann, B. and Wolinsky, E. (1976)

- Highly Reproducible Techniques for Use in Systematic Bacteriology in the Genus *Mycobacterium*: Test for Niacin and Catalase and for Resistance to Isoniazid, Thiophene 2-Carboxylic Acid Hydrazide, Hydroxylamidne and *P*-Nitrobenzoate..
Int. J. Syst. Bact. **26(3)**, 311-318.
- Wayne, L.G., y, and Diaz, G.A. (1982) Serological, Taxonomic, and Kinetic Studies of the Y and M Clases of Mycobacterial Catalase..
Int. J. Syst. Bact. **32(3)**, 296-304.
- Wayne, L.G. and Kubica G.P. (1986) Family *Mycobacteriaceae*, in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Eds. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. and Holt, J. *Williams and Wikins*, Baltimore. 1435
- Weber, A., Lutz, H. and Bauer, K. (1988) Detection of *Mycobacterium bovis* reinfections in cattle herds. *Berl. MÜnch. Tier. Wochen.* **101(9)**, 302-307.
- Weber, A., Lutz, H. and Bauer, K. (1988) Die derzeitige Bedeutung des Meschen für das Auftreten von *Mycobacteriumbovis*, in "Infektionen in Rinderbeständen". *Berl. München.*, Berlin. **101**, 341
- Wiker, H.G., Harboe, M., Nagai, S., Patarrollo, M.E., Ramirez, C. and Cruz, N. (1986) MPB59, a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.* **81**, 307-314.
- Wilesmith, J.W. (1991) Epidemiological method for investigating wild animal reservoirs of animal disease. *Rev. Sci. Tech.* **10**, 205-214.
- Wilks, C.R., Taylor, T.K., Rossel, E.G. and Thurston, T.R. (1981) Isolation of mycobacteria inducing cross-reaction in the complement fixation test for Johne's disease.. *Res. Vet. Sci.* **30**, 322-327.
- Wilson, A. (1971) Dictamen y Enfermedades Específicas. In *Inspección práctica de la carne*, pp. 99-102. Eds. Wilson, A.. Acribia, Zaragoza.
- Wolimsky, M.D. (1979) *Mycobacterium*, in "Tratado de Microbiología". Eds. Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, W. and McCarty, M. *Salvat*. 2ª Edición, Barcelona. 867-892

Wood, P.R., Ripper, J., Radford, A.J., Bundensen, P.G., Rylatt, D.B., Cottis, L.E., John, M. and Plakett, P. (1988) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2599-2604.

Wood, P., Fifis, T., Corner, L. and Radford, A. (1989) Isolation and Characterisation of an Immunodominant Protein from *Mycobacterium bovis*. *Acta Leprosica* 7(1), 186-187.

Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormicks, B.S., Francis, B.R., Crreper, J. and Tweddle, N.E. (1991) Fiels comparison of the interferon-gamma and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68, 286-290.

Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K. and Witte, K. (1992) A field evaluation of serological and cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31(1), 71-79.

Yamamura, Y., Misaki, A. and Azuma, I. (1972) Chemical and immunological studies on polysaccharide antigens of micobacteria, nocardia and corinebacteria. *Bull. Un. Int. Tuberc.* 47, 181-191.

Yokomizo, Y., Yugi, H. and Mercal, R.S. (1985) A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47(1), 111-119.

AGRADECIMIENTOS

A D. Fernando Real Valcárcel, mi más sincero agradecimiento por su compañerismo, dedicación y orientación constante durante la realización de este trabajo.

A D. Luis León Vizcaíno, profesor Catedrático de "Enfermedades Infecciosas" de la Universidad de Murcia, por su asesoramiento.

A D. Manuel Casal, Catedrático de la "Facultad de Medicina" de la Universidad de Córdoba, por su asesoramiento técnico.

A Dña. Pilar Santana, Lda. en Farmacia y técnica de nuestro laboratorio, que con su amistad, empeño, esmero y dedicación, ha hecho que esta tarea fuera más llevadera.

A. D. José Poveda y a Dña Soraya Déniz, por su extraordinario compañerismo, apoyo y ayuda constante que de ellos hemos recibido

A D. Sadamu Nagai del Instituto "Tuberculosis Research" (Japón), por proveernos el antígeno MPB70 siempre que hizo falta.

A D. José Ramón Jara Vera del Laboratorio de Sanidad Animal de Murcia por suministrarnos los sueros del grupo de caprinos infectados por *M. avium subsp. paratuberculosis*.

A D. Amado Ramos, Director del Matadero Municipal de Las Palmas, por su colaboración y ayuda en el sacrificio e inspección de los caprinos positivos a la intradermorreacción tuberculínica.

A D. Francisco Fabelo, Veterinario de la Granja del Cabildo de Lanzarote, por cedernos el grupo de caprinos exentos de infección por *M. bovis* y por su gran prestación para que este trabajo llegara a su término.

A D. Javier Jeo, Veterinario campañista en la isla de Lanzarote, por su gran colaboración y trabajo en la obtención del muestreo serológico de dicha isla.

A. Dña. Emilia Ramos, Veterinaria campañista en la isla de Gran Canaria, por su gran colaboración y trabajo en la obtención del muestreo serológico de dicha isla.

A D. Salvador, ganadero que dispuso su ganado seudotuberculoso a nuestra experiencia.

A los Veterinarios de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca, que nos suministraron el grupo de animales infectados por *M. bovis*.

Al Moredun Research Institute (Edinburgo) que nos remitió el suero libre de agentes patógenos.

A los miembros del departamento de Microbiología y Fisiología de la Facultad de Medicina de Las Palmas, por cedernos parte de sus instalaciones para empezar a trabajar, cuando las nuestras eran demasiado precarias.

A la Fundación Universitaria de Las Palmas, que nos concedió una beca con la que se pudo comenzar este trabajo.

A todos los compañeros de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, que con su apoyo e ilusión han estimulado la finalización de este trabajo.

A todos aquellos, que de una forma u otra, han contribuido a hacer más fácil la materialización de esta tesis.

FIGURAS

ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70
CONCENTRACION DE ANTIGENO 0.5µg/pocillo

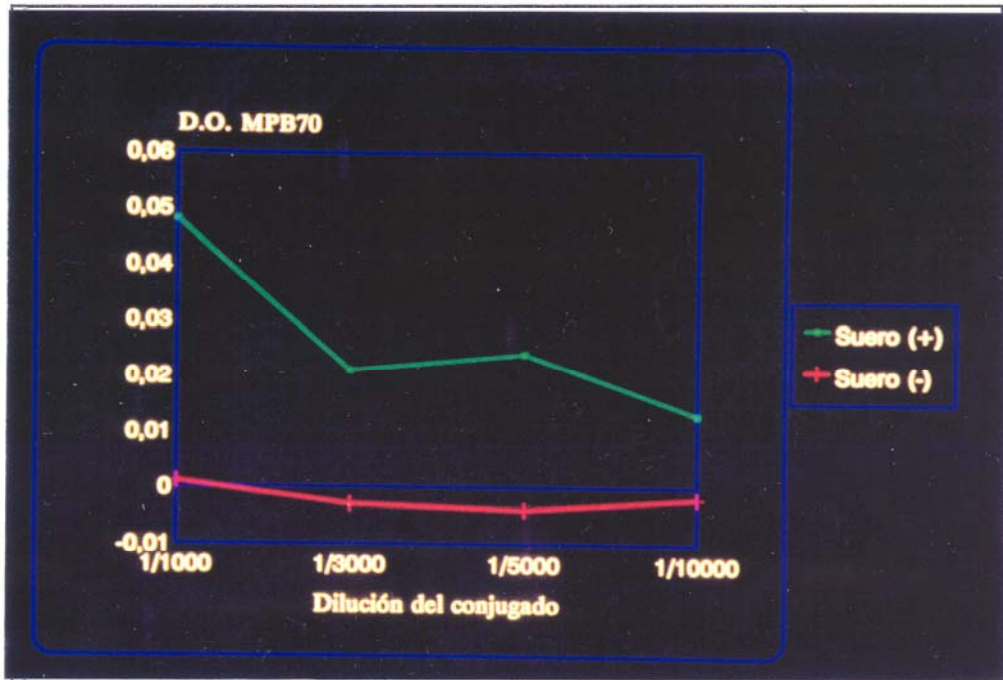


FIGURA I.-Dilución del suero 1/25

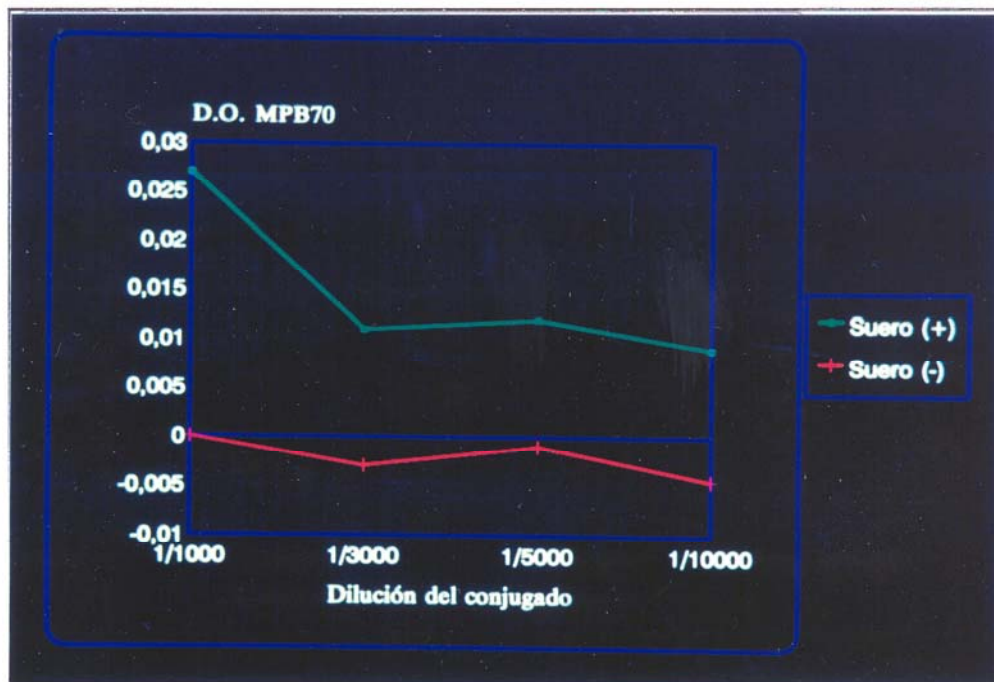


FIGURA II.-Dilución del suero 1/50

ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70
 CONCENTRACION DE ANTÍGENO 0.5µg/pocillo

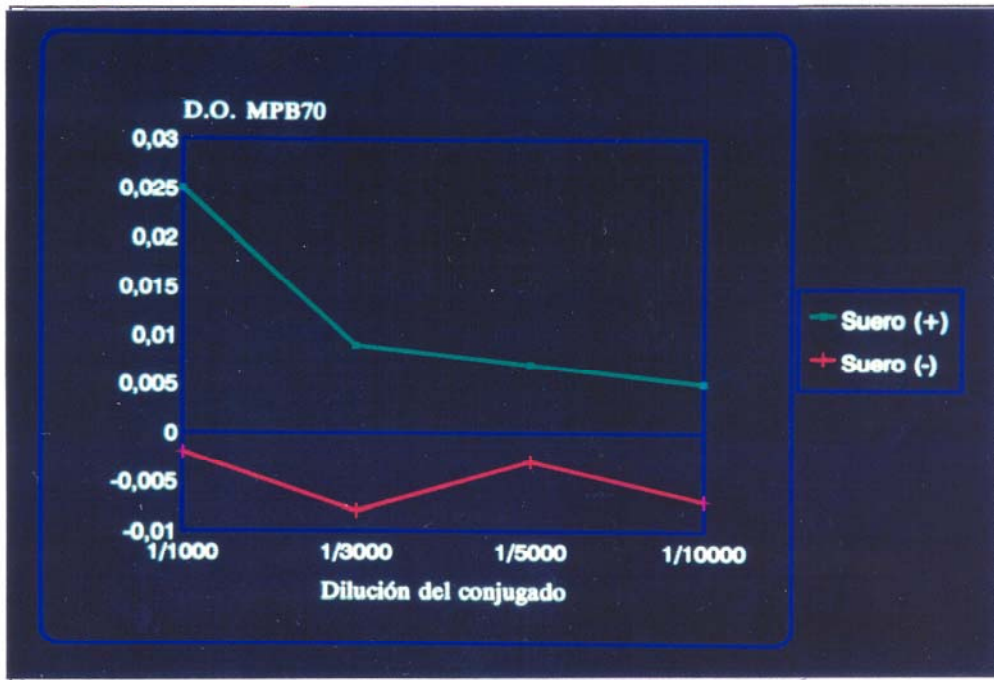


FIGURA III.-Dilución del suero 1/100

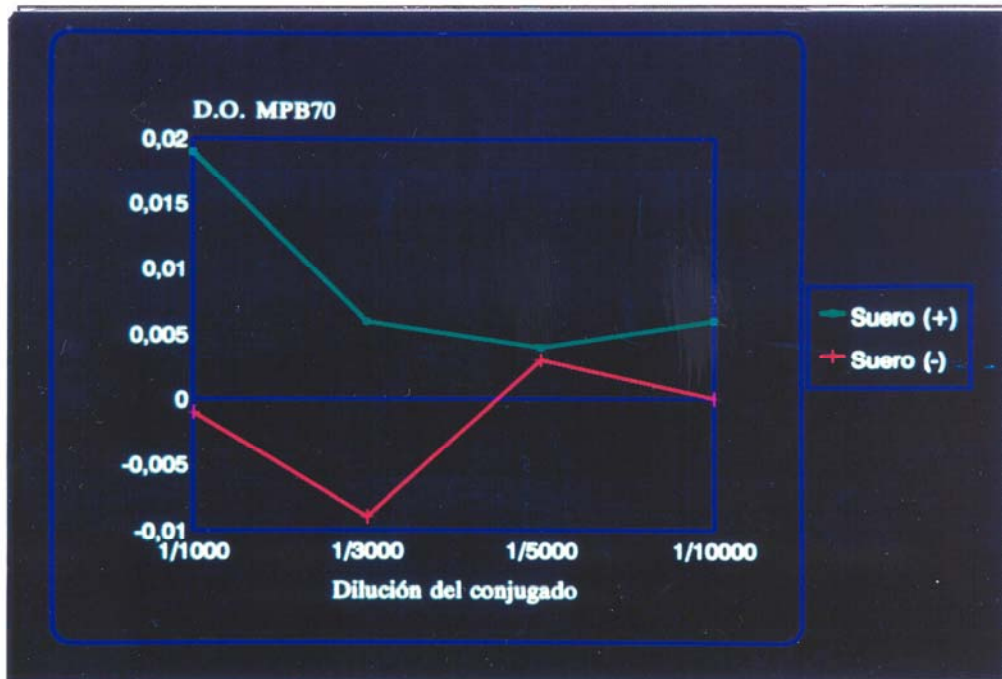


FIGURA IV.-Dilución del suero 1/200

ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70
CONCENTRACION DE ANTÍGENO 0.5 μ g/pocillo

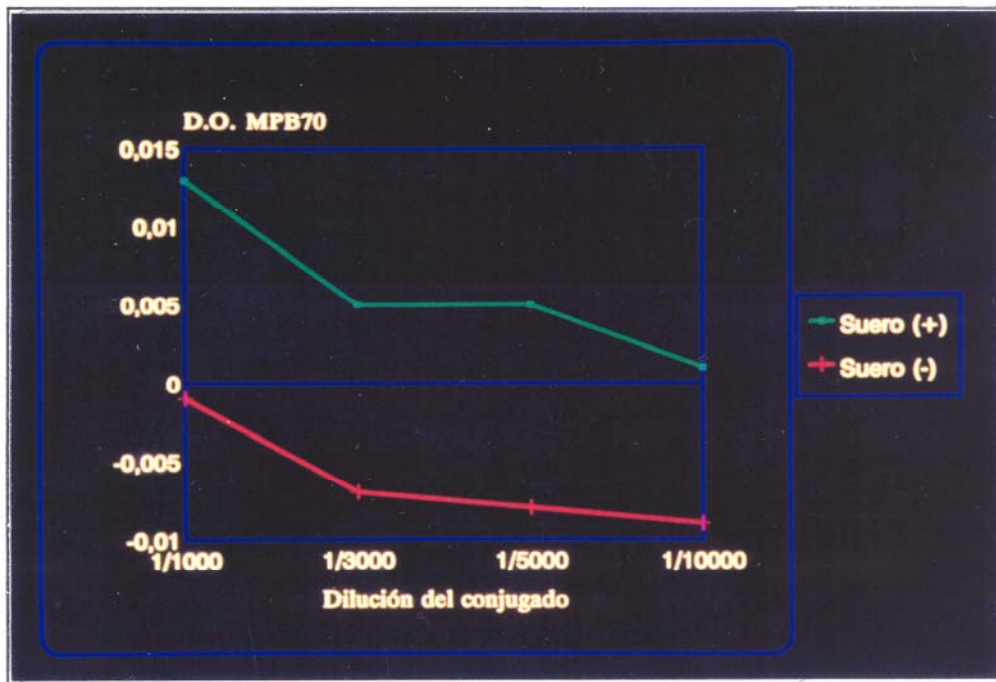


FIGURA V.-Dilución del suero 1/400

ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70
CONCENTRACION DE ANTÍGENO 3 μ g/pocillo

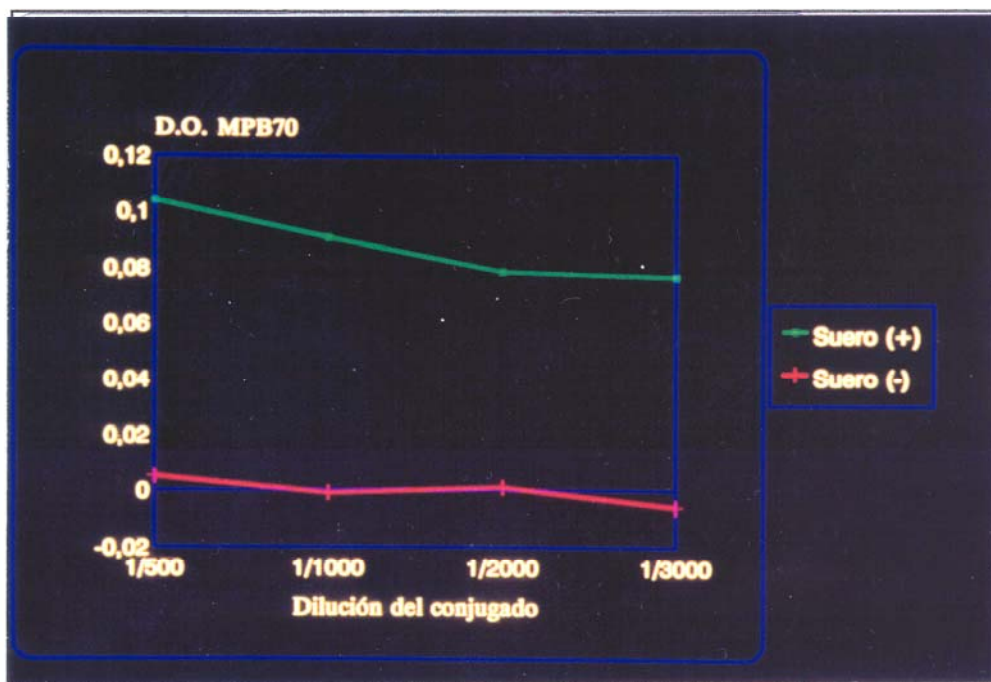


FIGURA VI.-Dilución del suero 1/25

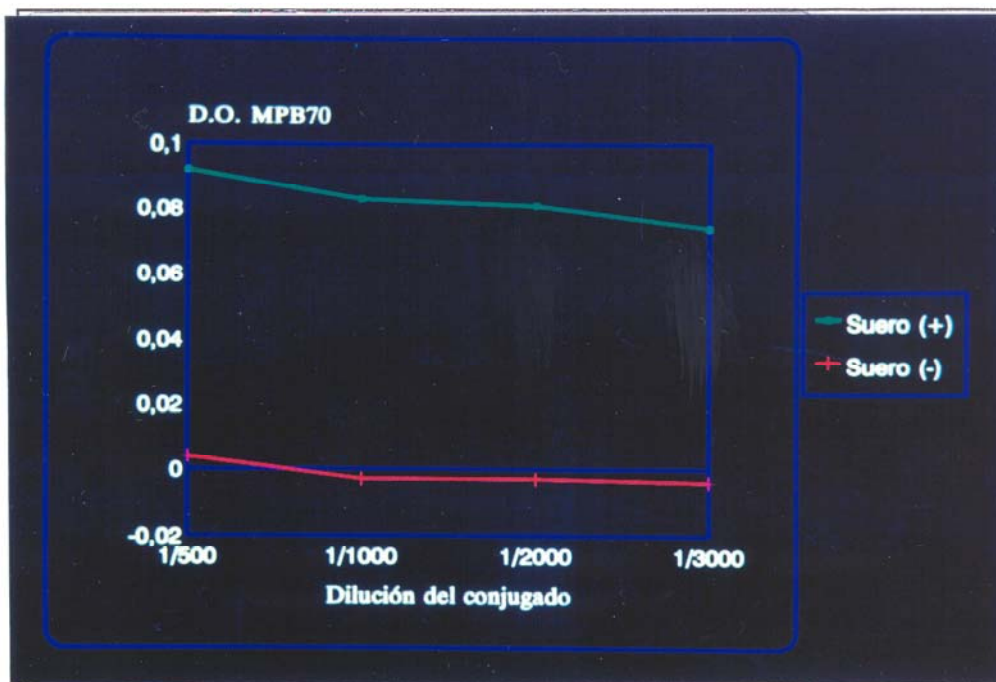


FIGURA VII.-Dilución del suero 1/50

ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70
CONCENTRACION DE ANTÍGENO 3 μ g/pocillo

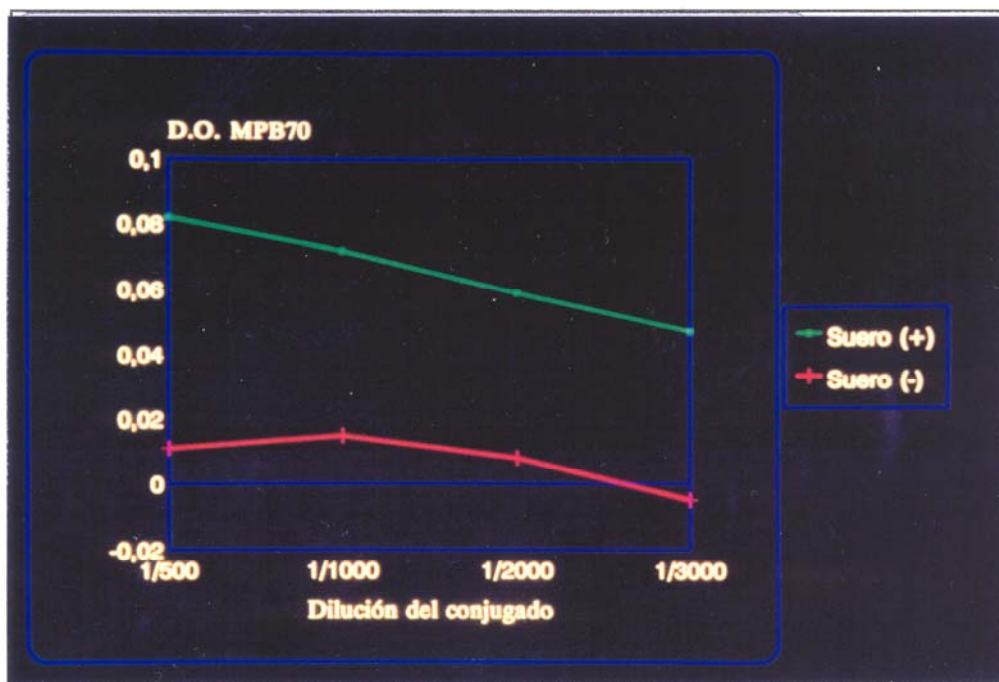


FIGURA VIII.-Dilución del suero 1/100

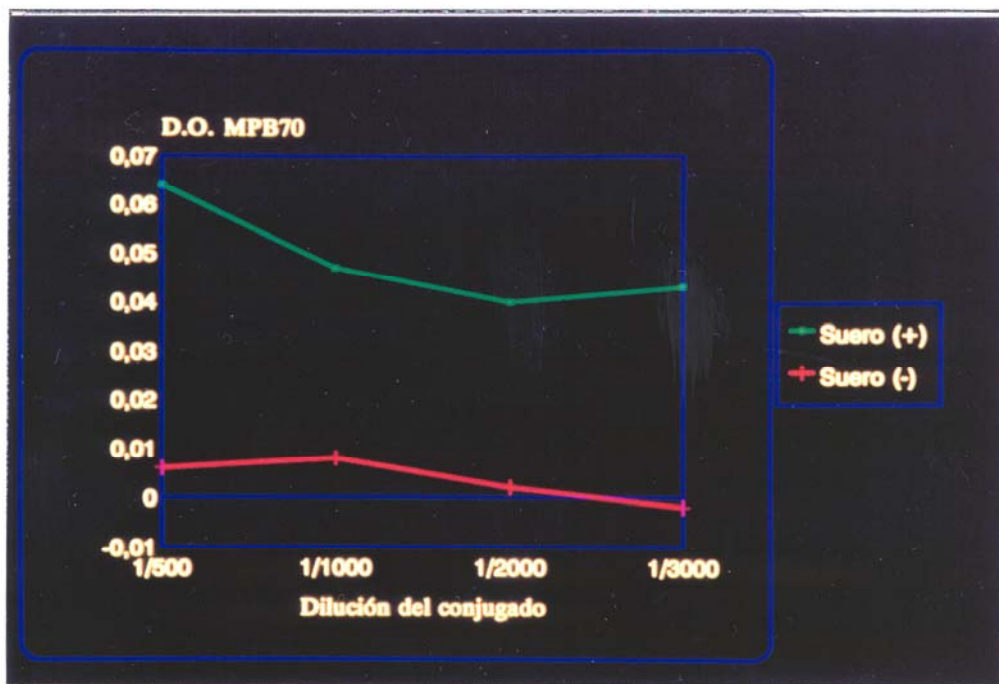


FIGURA IX.-Dilución del suero 1/200

ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA ELISA CON ANTIGENO MPB70
CONCENTRACION DE ANTÍGENO 3 μ g/pocillo

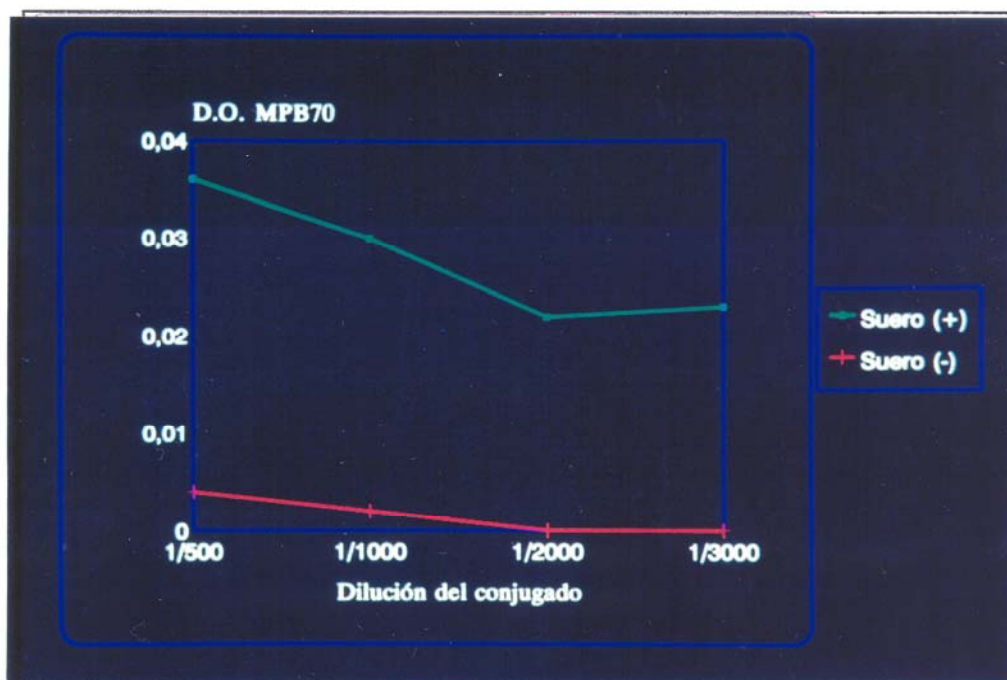


FIGURA X.-Dilución del suero 1/400

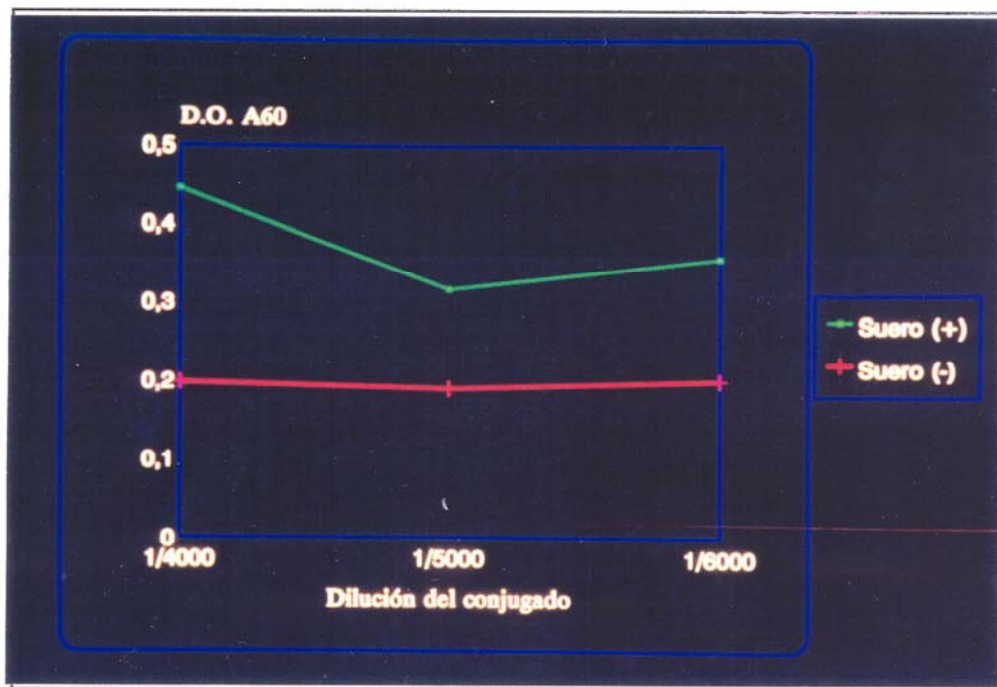


FIGURA XI.- Estandarización del ELISA con antígeno A60.

RESULTADOS DEL LOTE TESTIGO DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*. Y NO TUBERCULINIZADAS

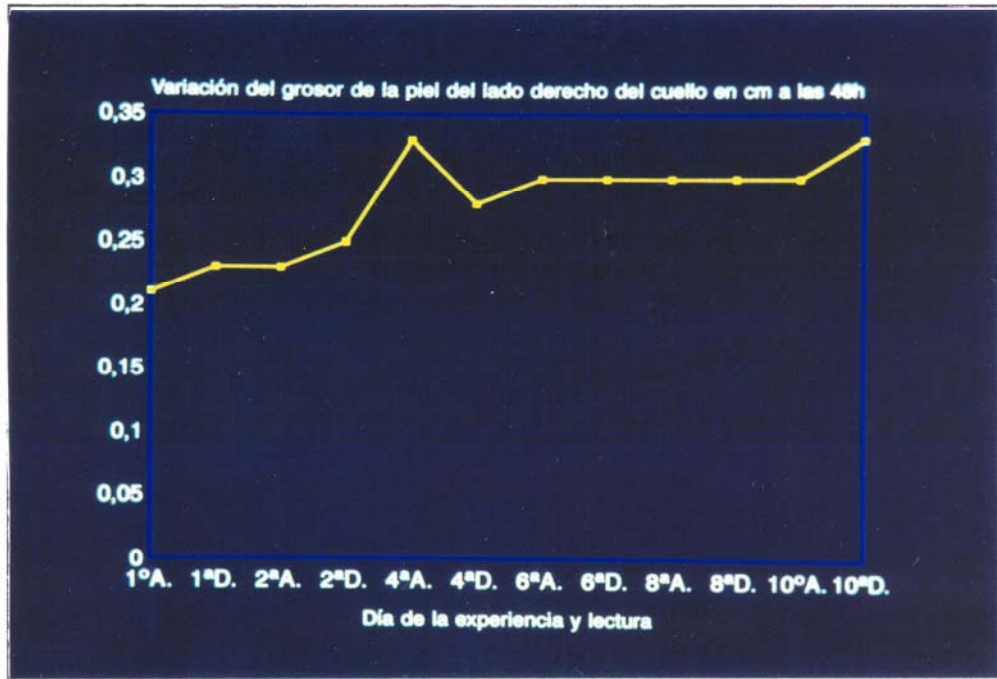


FIGURA XII.-Resultados de la medición del grosor de la piel del lado derecho del cuello a lo largo de la experiencia.

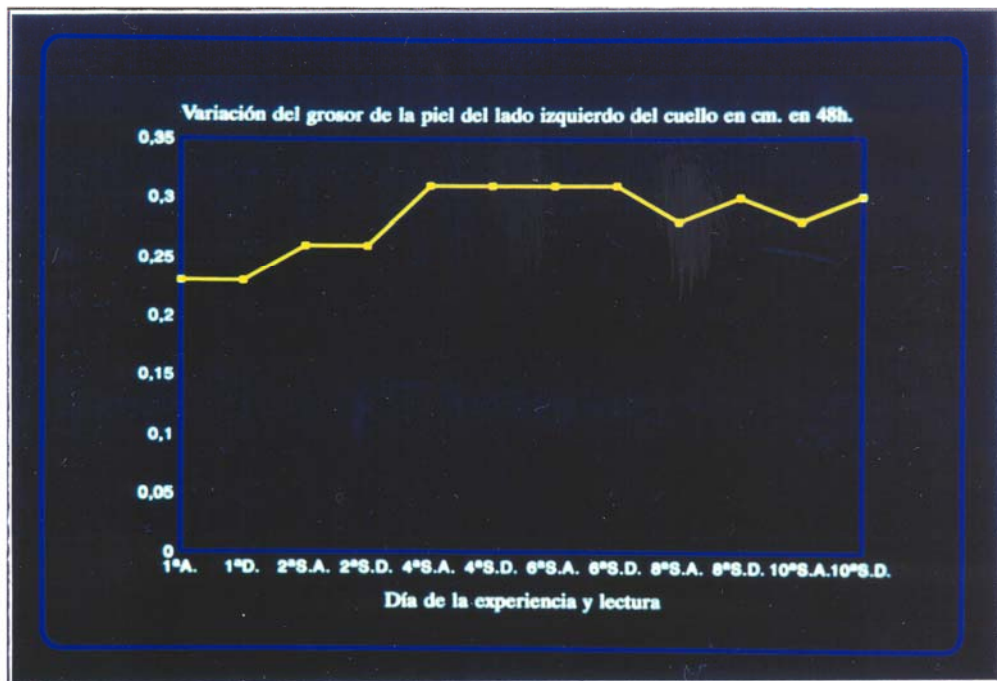


FIGURA XIII.-Resultados de la medición del grosor de la piel del lado izquierdo del cuello a lo largo de la experiencia.

RESULTADOS DEL LOTE TESTIGO DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*. Y NO TUBERCULINIZADAS

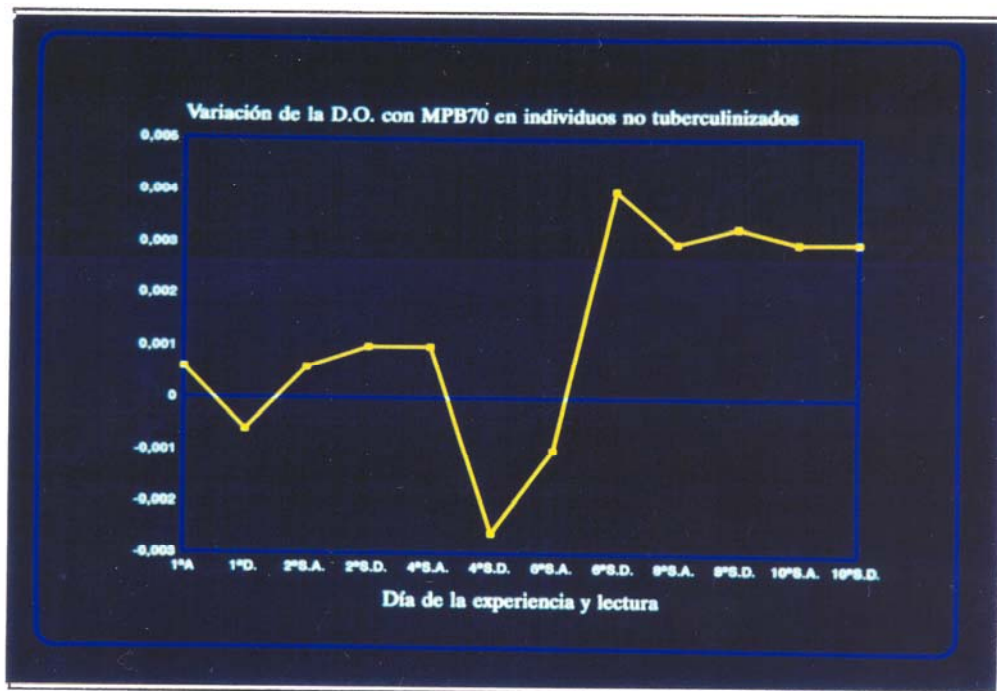


FIGURA XIV.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70

RESULTADOS DEL LOTE 5 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

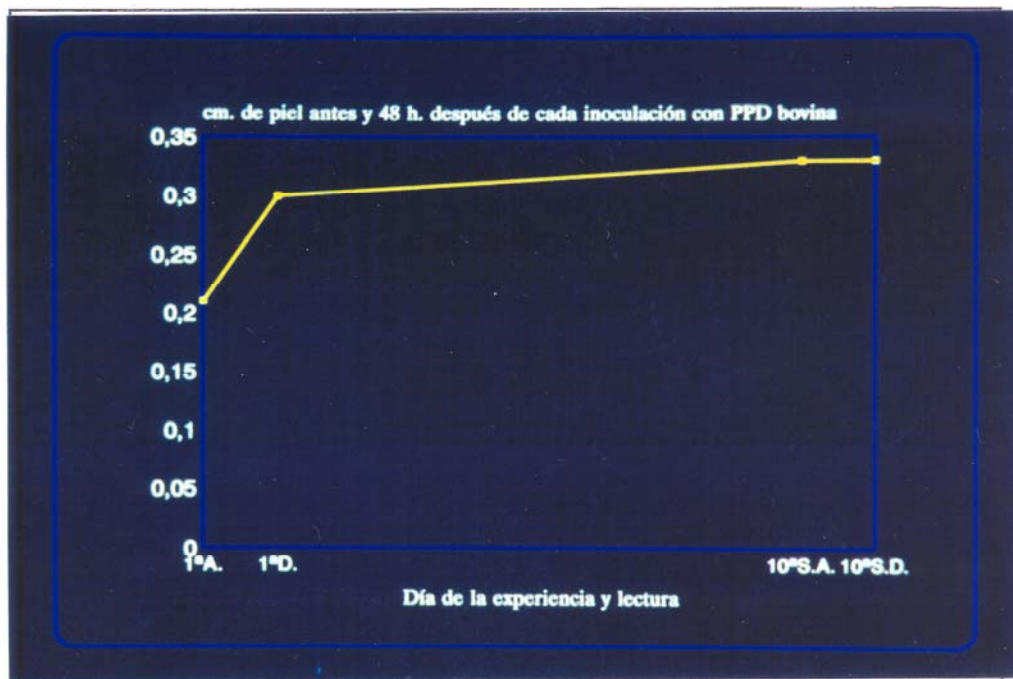


FIGURA XV.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD bovina.

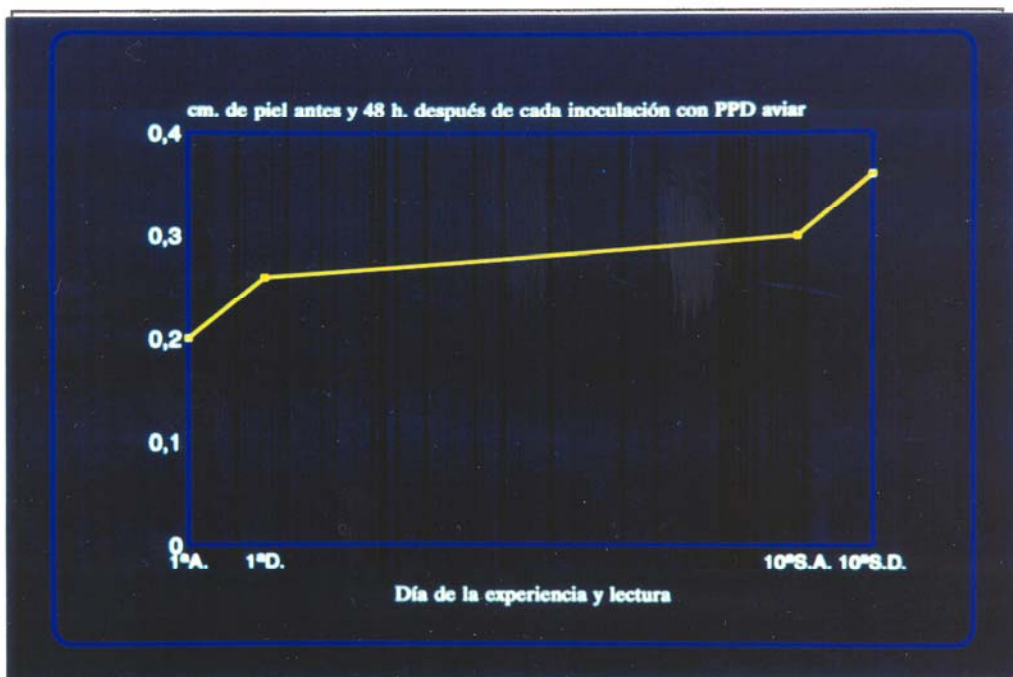


FIGURA XVI.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD aviar.

RESULTADOS DEL LOTE 5 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

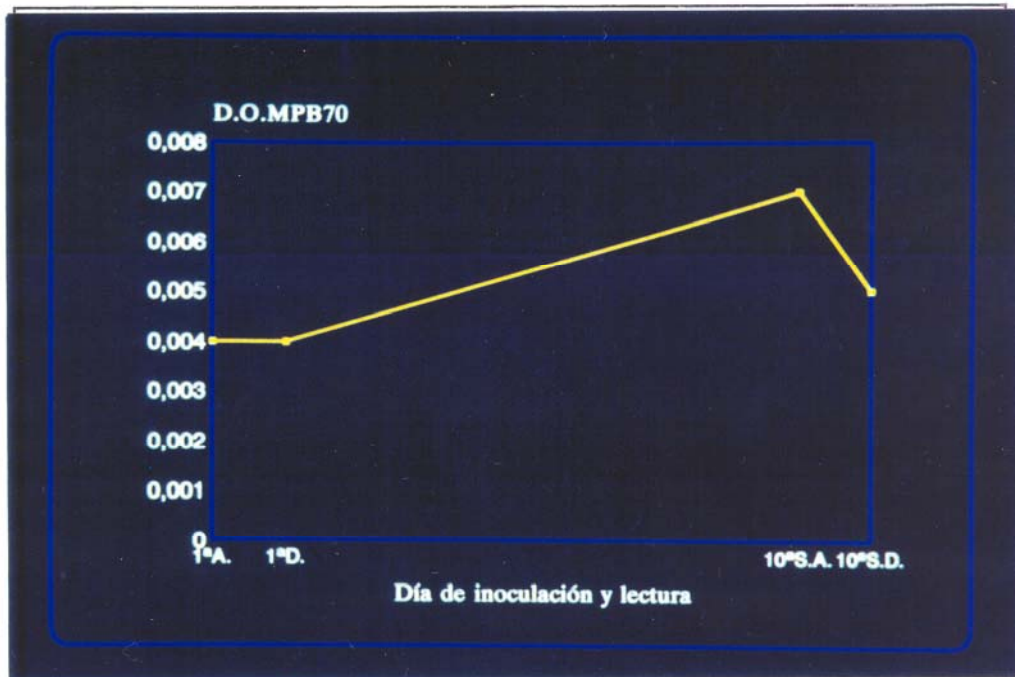


FIGURA XVII.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70

RESULTADOS DEL LOTE 4 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

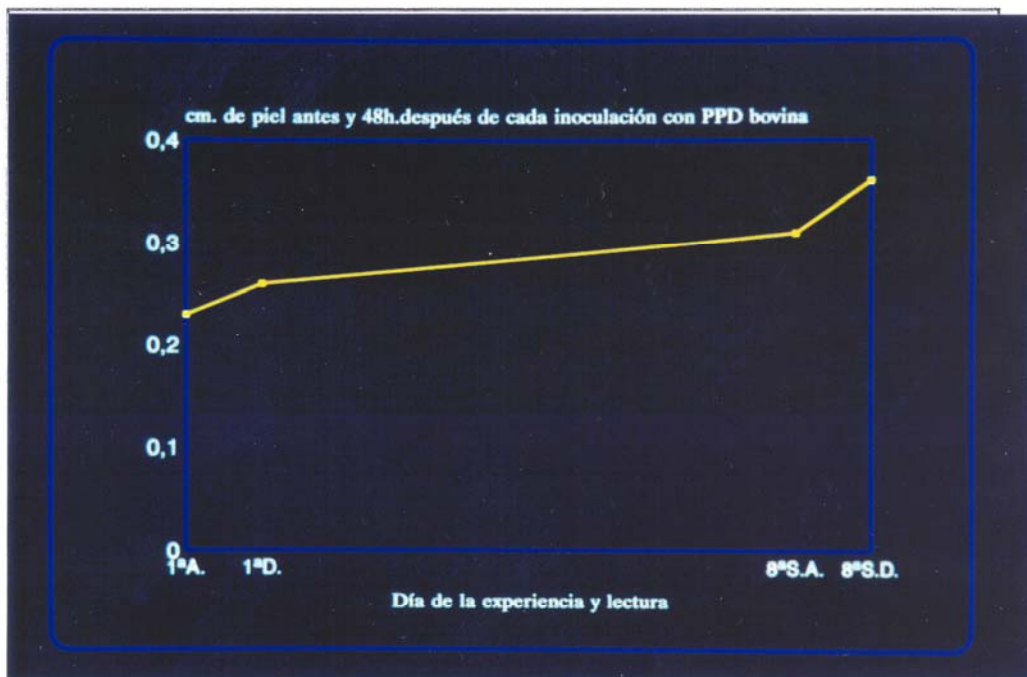


FIGURA XVIII.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD bovina.

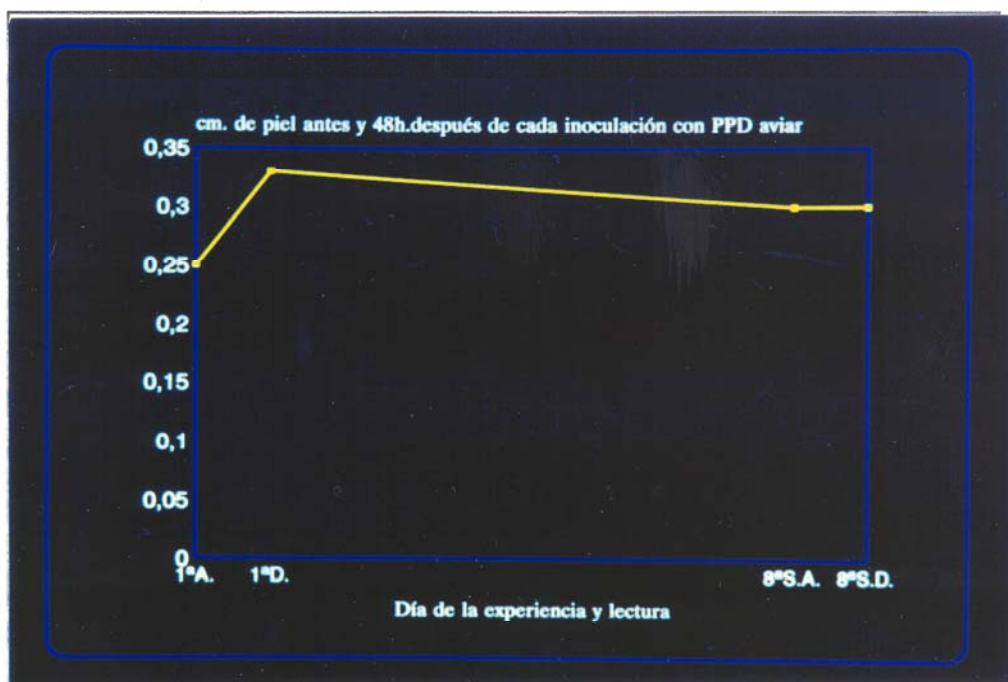


FIGURA XIX.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD aviar.

RESULTADOS DEL LOTE 4 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

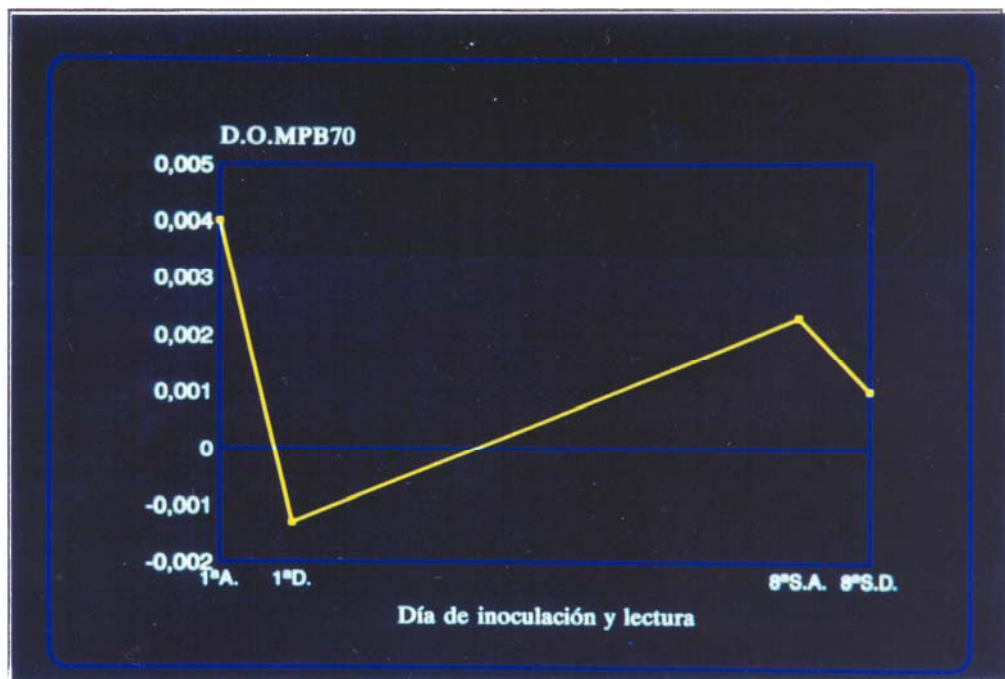


FIGURA XX.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70.

RESULTADOS DEL LOTE 3 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

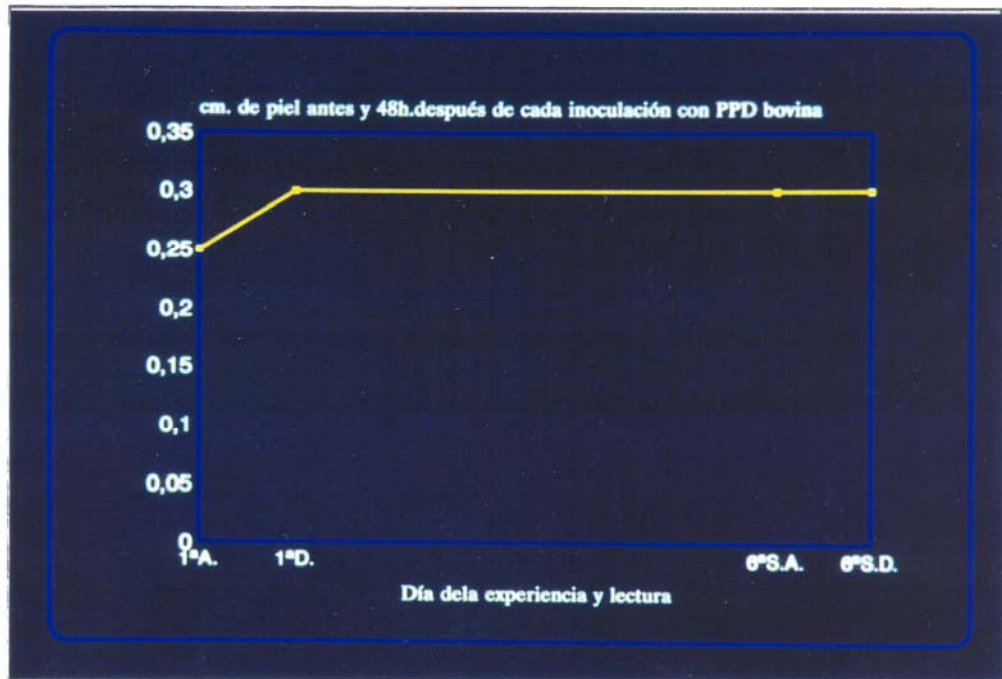


FIGURA XXI.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD bovina.

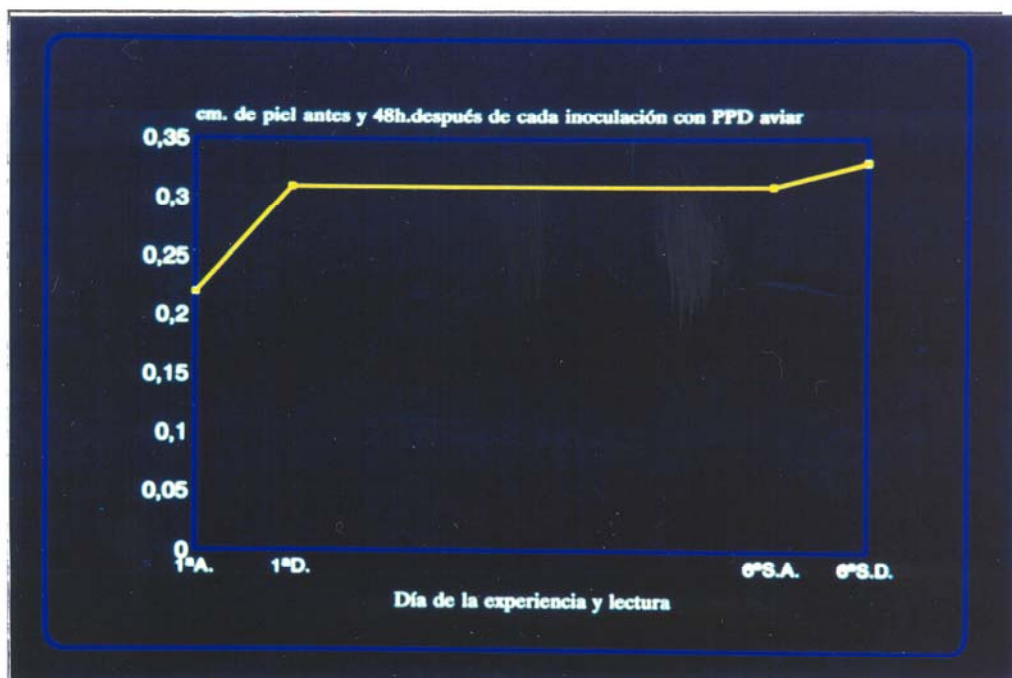


FIGURA XXII.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD aviar.

RESULTADOS DEL LOTE 3 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

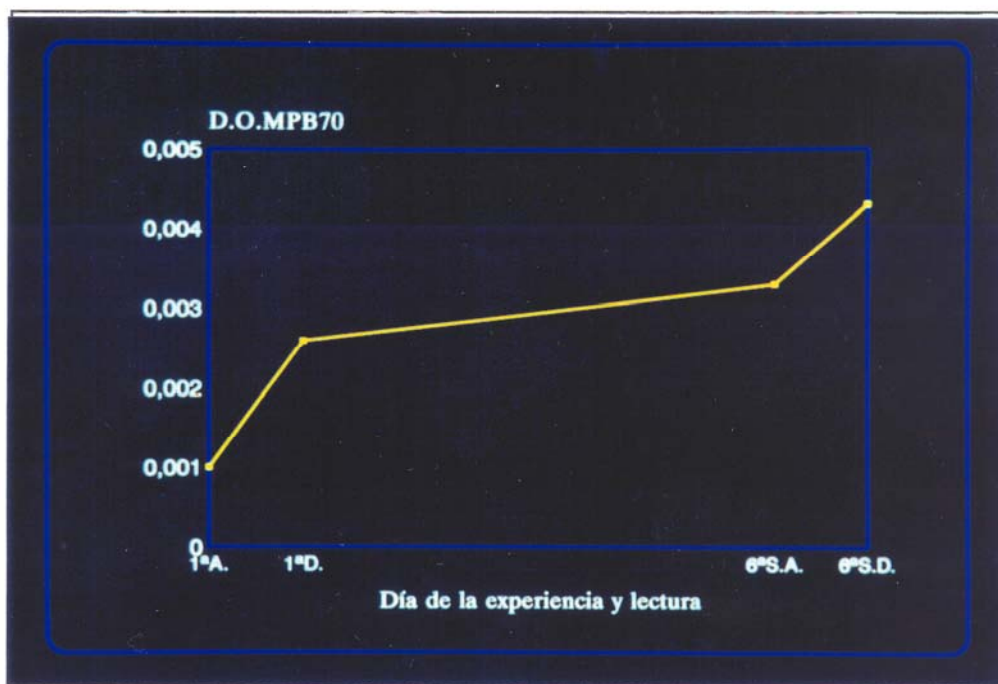


FIGURA XXIII.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70.

RESULTADOS DEL LOTE 2 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

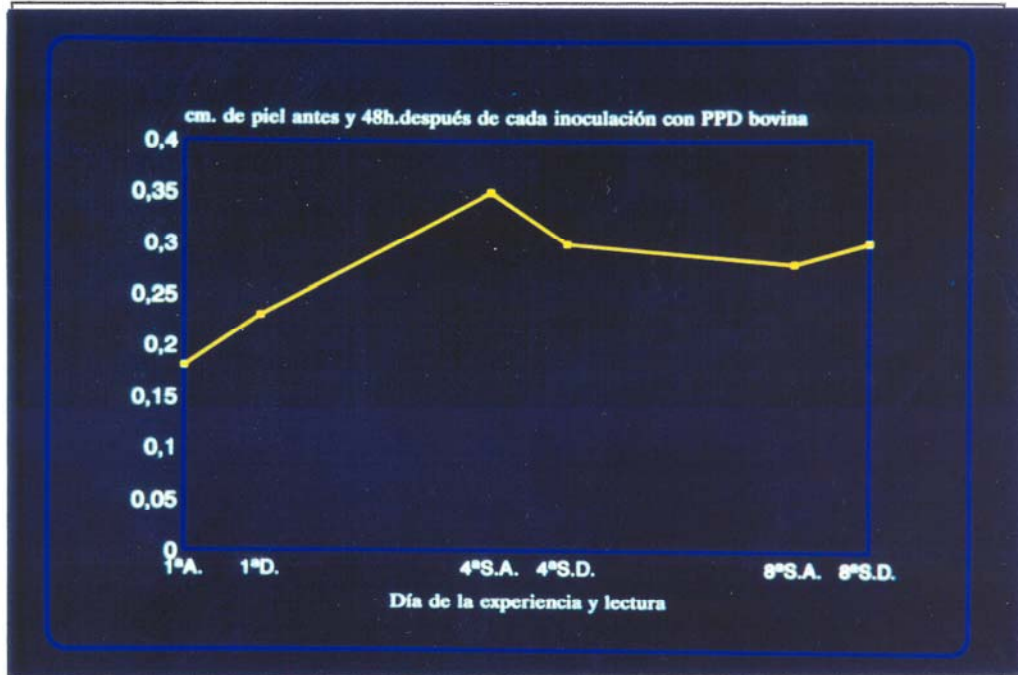


FIGURA XXIV.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD bovina.

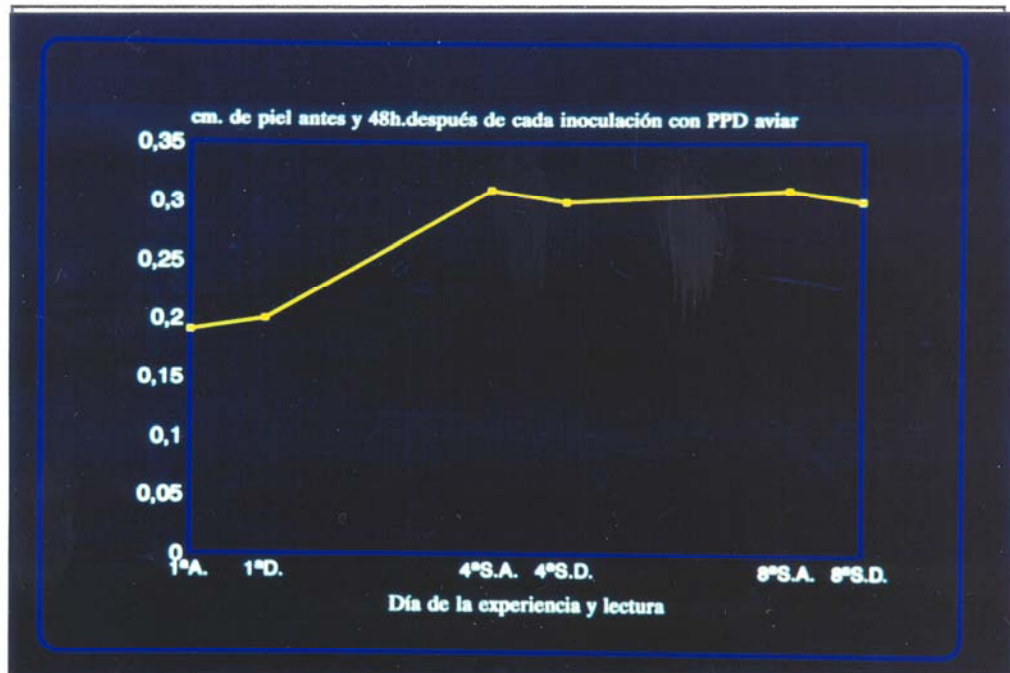


FIGURA XXV.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD aviar.

RESULTADOS DEL LOTE 2 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

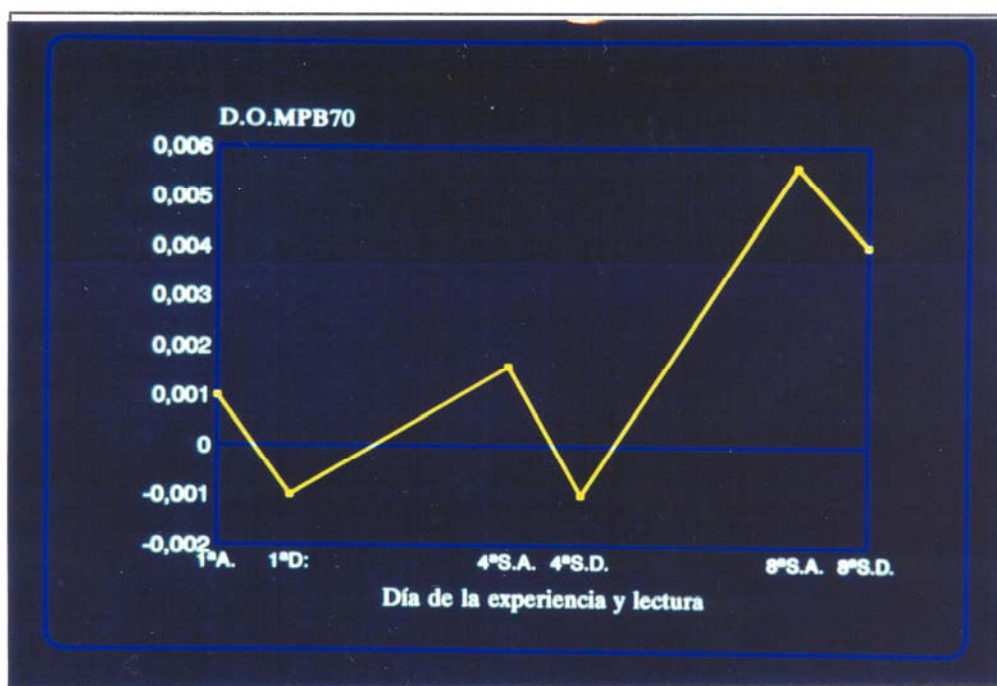


FIGURA XXVI.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70.

RESULTADOS DEL LOTE 1 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

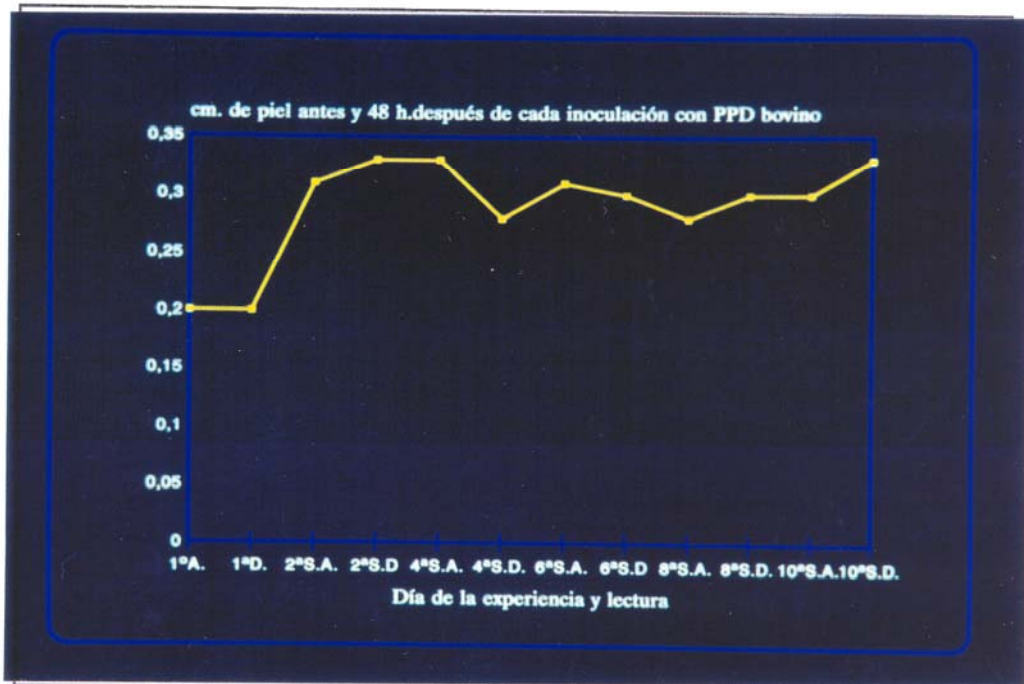


FIGURA XXVII.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD bovina.

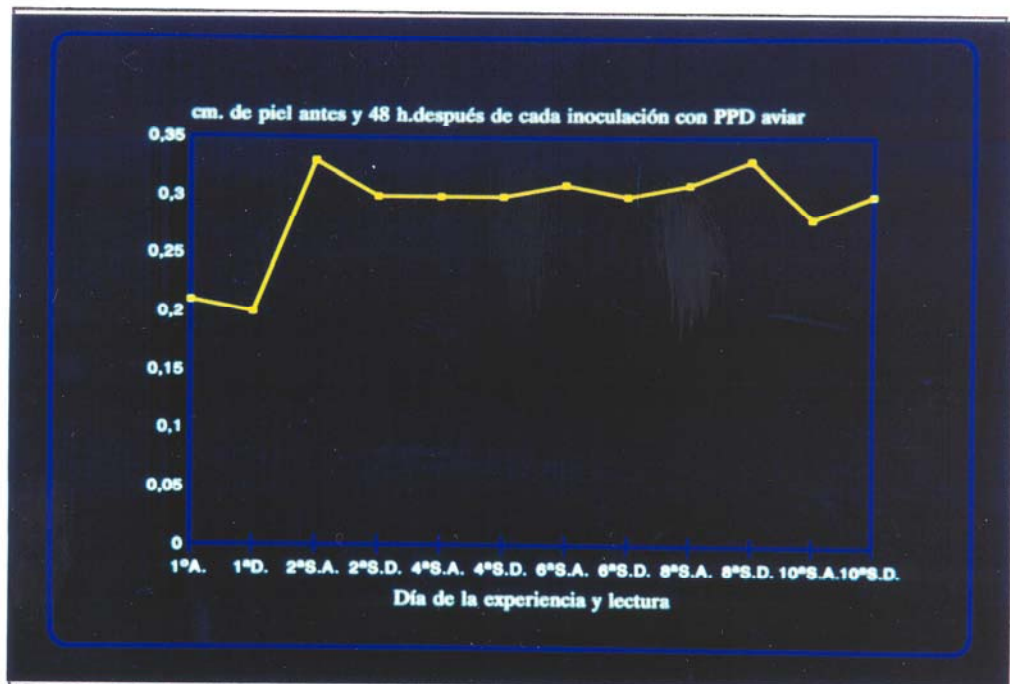


FIGURA XXVIII.-Resultados de la tuberculinización repetida con PPD aviar.

RESULTADOS DEL LOTE 1 DE CABRAS CONSIDERADAS EXENTAS DE LA INFECCION POR *M.bovis*.

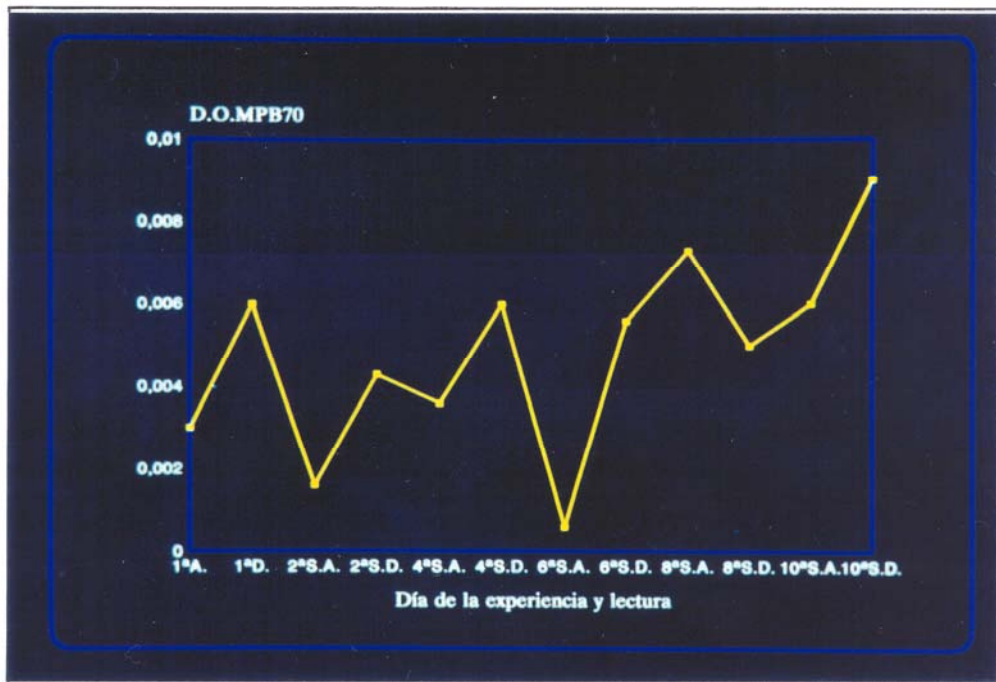


FIGURA XXIX.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70.

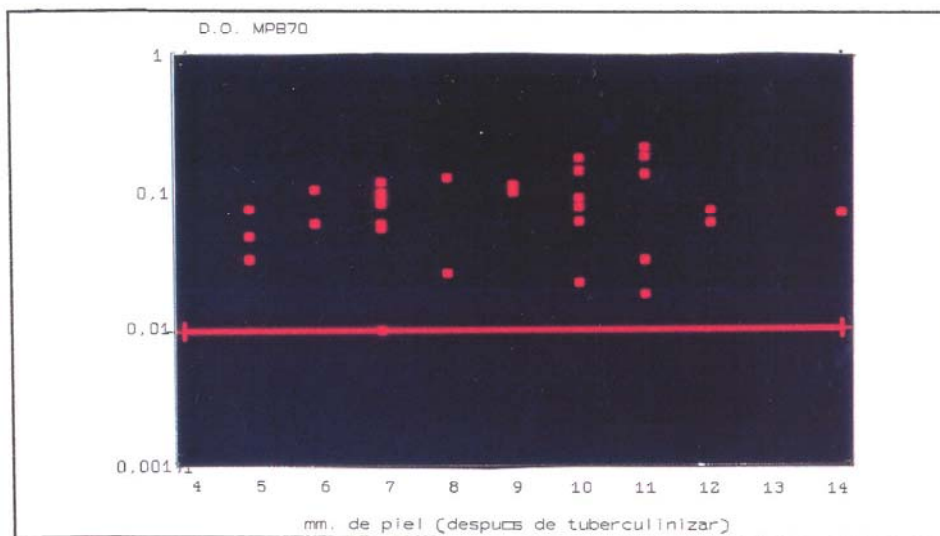


FIGURA XXX.-Resultados de la tuberculinización y del ELISA con MPB70 del lote de cabras con una presunta infección natural por *M.bovis*.

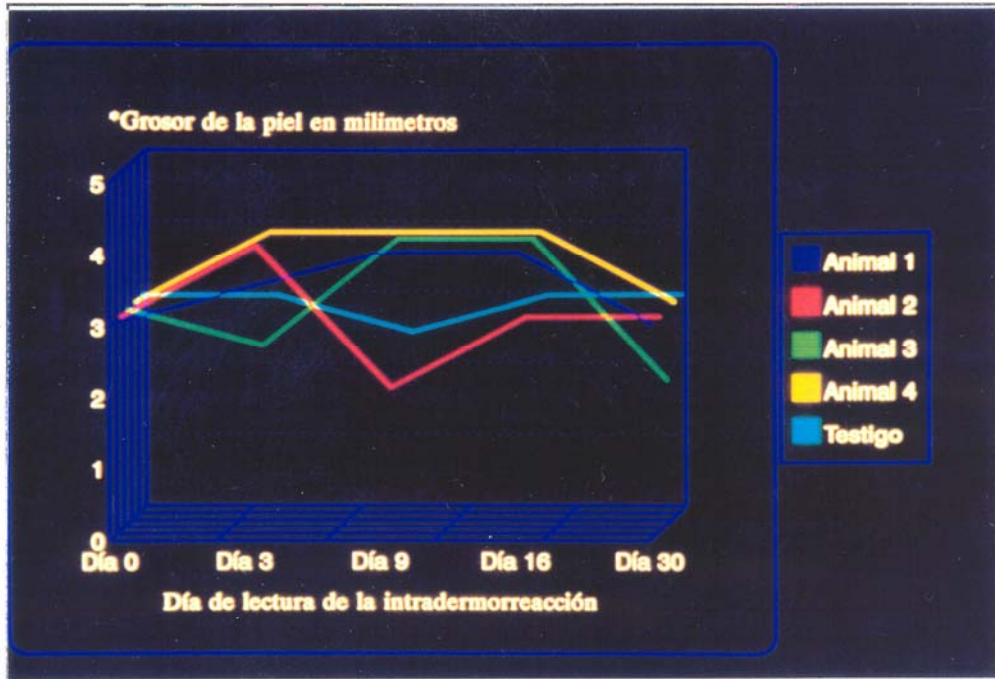


FIGURA XXXI.-Resultados de la intradermorreacción tuberculínica con PPD bovina del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

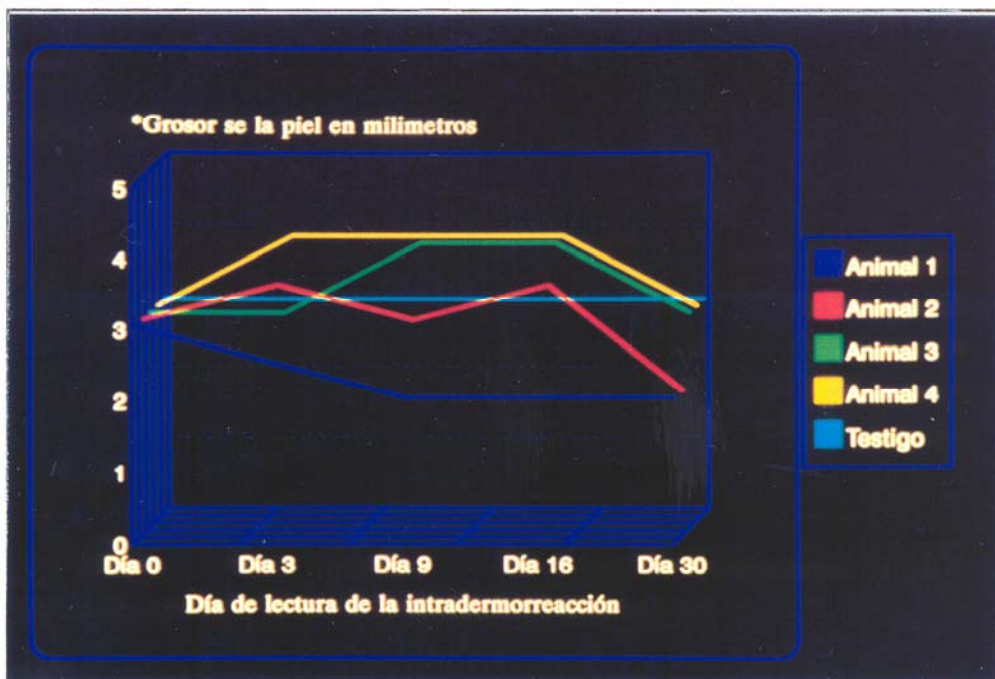


FIGURA XXXII.-Resultados de la intradermorreacción tuberculínica con PPD aviar del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

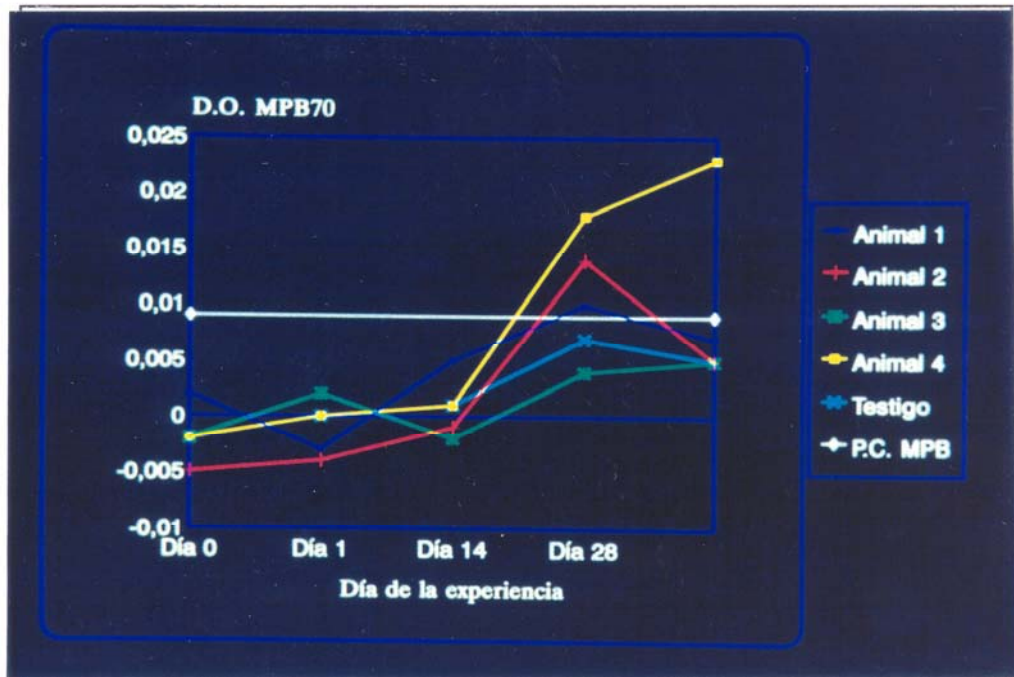


FIGURA XXXIII.-Resultados al ELISA con antígeno MPB70 del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras cuatro sucesivas tuberculinizaciones.

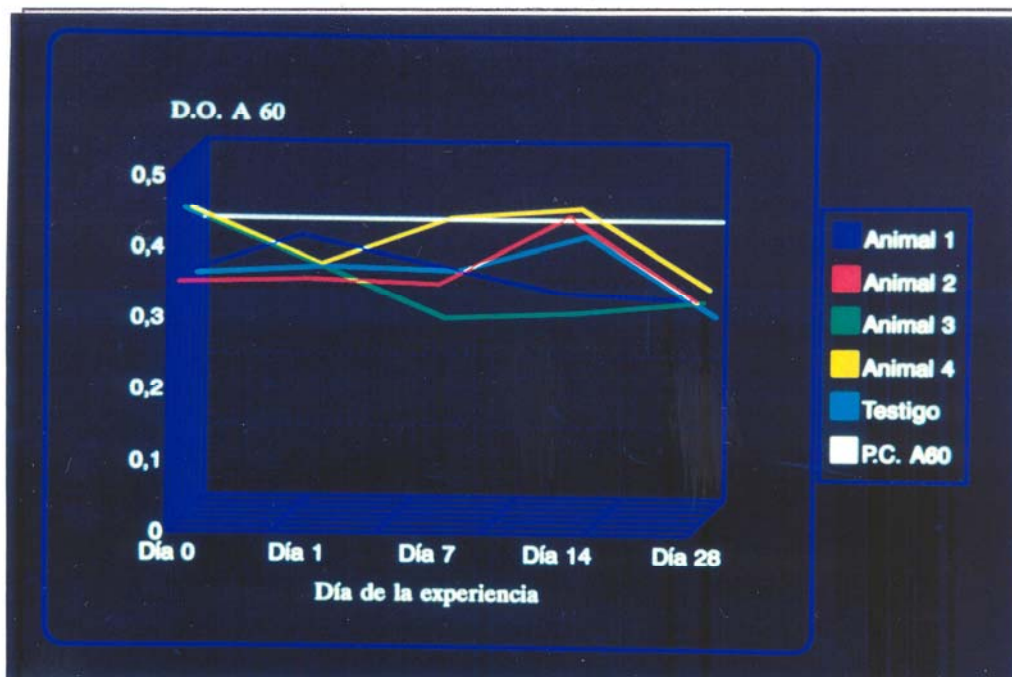
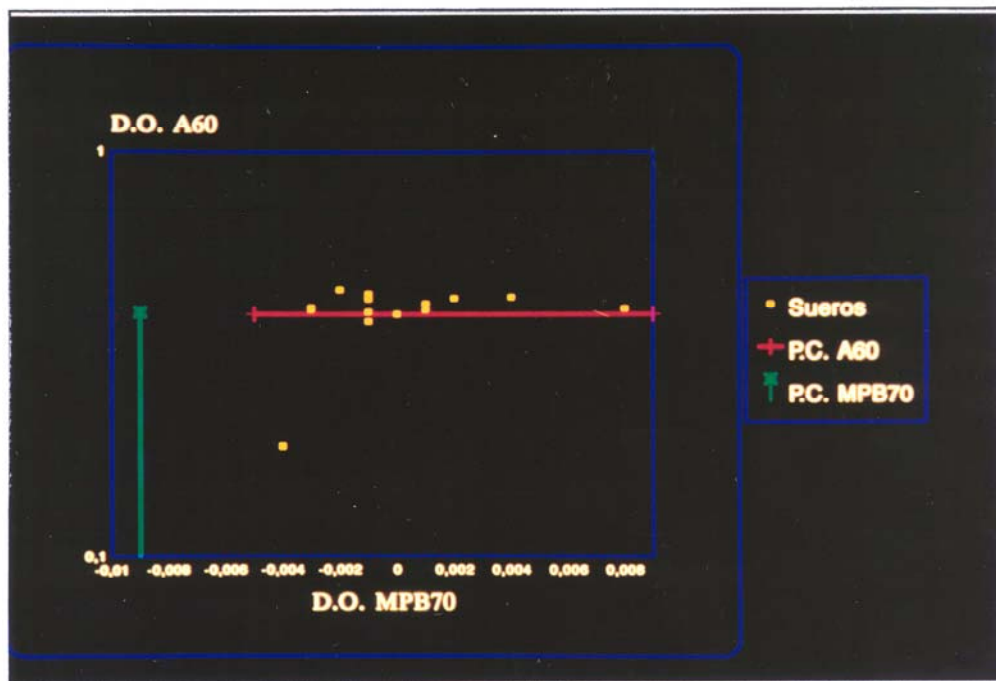


FIGURA XXXIV.-Resultados al ELISA con antígeno A60 del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras cuatro sucesivas tuberculinizaciones.

PUNTO DE CORTE PARA EL ANTIGENO MPB70 FUE DE 0.009



GRAFICA XXXV.-Resultados con la técnica ELISA con los antígenos MPB70 y A60 en el grupo de cabras con una infección natural por *M. avium subsp paratuberculosis*.

TABLAS

TABLA I.- TABLA INTERNACIONAL DE MUESTREO (American-British-Canadian).NIVEL NORMAL

NIVEL DE MUESTREO NORMAL		
TAMAÑO DEL LOTE	NIVEL I	TAMAÑO DE LA MUESTRA
2 a 8	A	2
9 a 15	A	2
16 a 25	B	3
26 a 40	B	3
41 a 65	C	5
66 a 110	D	7
111 a 180	E	10
181 a 300	F	15
301 a 500	G	25
501 a 800	H	35
801 a 1300	I	50
1301 a 3200	J	75
3200 a 8000	L	110
8001 a 22000	M	150
22001 a 110000	N	225
110001 a 550000	O	300
550001 en adelante	P	450

TABLA II.- Características de las muestras estudiadas.

GRUPO	ESPECIE	Nº DE ANIMALES	TIPO DE INFECCION
1	caprina	32	Animales infectados de forma natural por <i>M.bovis</i> , dos de ellos diagnosticados microbiológicamente y todos positivos a la intradermorreacción con PPD bovino y negativos al PPD aviar.
2	caprina	15	Animales infectados de forma natural por <i>M.avium subsp. paratuberculosis</i> , uno de ellos diagnosticado microbiológicamente, todos positivos a la intradermorreacción con PPD aviar y negativo todos al PPD bovino. Positivos a la avidina-biotina.
3	caprina	5	Animales infectados de forma natural por <i>C.pseudotuberculosis</i> . Todos ellos diagnosticados microbiológicamente, todos negativos a la intradermorreacción con PPD bovino y PPD aviar.
4	caprina	21	Procedentes de una explotación sin antecedentes de tuberculosis. Negativos a la intradermorreacción con PPD bovino y aviar.

TABLA III.- Experiencia de tuberculización en el grupo de cabras exentas de infección por *M. bovis*.

LOTE	nº cabra	Día1	2ªsemana	4ªsemana	6ªsemana	8ªsemana	10ªsemana	12ªsemana
1	1	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+
2	4	+	-	+	-	+	-	+
	5	+	-	+	-	+	-	+
	6	+	-	+	-	+	-	+
3	7	+	-	-	+	-	-	+
	8	+	-	-	+	-	-	+
	9	+	-	-	+	-	-	+
4	10	+	-	-	-	+	-	-
	11	+	-	-	-	+	-	-
	12	+	-	-	-	+	-	-
5	13	+	-	-	-	-	+	-
	14	+	-	-	-	-	+	-
	15	+	-	-	-	-	+	-
6	16	+	-	-	-	-	-	-
	17	+	-	-	-	-	-	-
	18	+	-	-	-	-	-	-
TESTIGO	19	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-

El signo + indica que hay que tuberculizar en la fecha especificada. El signo (-) indica que no se ha de tuberculizar a ese animal en la fecha especificada.

TABLA IV.- Grupo de cabras con presunta infección natural por *M.bovis*. Lectura de la intradermo reacción tuberculínica.

Nº ANIMAL	Nº CROTAL*	LECTURA 48H**
1	5897	7
2	5859	7
3	5856	5
4	5826	7
5	5871	7
6	5838***	12
7	4326	7
8	4309	9
9	5863	5
10	4331	7
11	5818	6
12	5891	11
13	5882	11
14	4378	10
15	5805	10
16	5852	10
17	5890	6
18	5865	9
19	5885***	12
20	5858	8
21	4387	10
22	5873	10
23	5842	10
24	5840	11
25	5830	7
26	5845	7
27	5879	9
28	5821	14
29	5854	11
30	5803	11
31	5817	8
32	3454	5

* Nº de Campaña de los animales según la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca

**Diferencia entre el grosor de la piel antes y después de tuberculinizar (en mm).

***Animales de los que se aisló *M.bovis* a partir de las lesiones.

TABLA V.-CLASIFICACIÓN DE *Mycobacterium spp.* SEGUN LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS

ESPECIE	VELICIDAD CRECIMIENTO	PRODUCCION DE NIACINA	REDUCCIO N NITRATOS	CATALASA 22°C.45mm	CATALASA 68°C	HIDROLISIS TWEEN 80	CRECIMIENTO EN TCH
<i>M.tuberculosis</i>	LENTO	+	+ .	-	-	V	+
<i>M.bovis</i>	LENTO	-	-	-	-	-	-
<i>M.africanum</i>	LENTO	V	V	-	-		-
<i>M.marinum</i>	LENTO	-	-	-	+	+	+
<i>M.kansasii</i>	LENTO	-	+	+	+	+	+
<i>M.scrofulaceum</i>	LENTO	-	-	+	+	-	+
<i>M.gordonae</i>	LENTO	-	-	+	+	+	+
<i>M.szulgai</i>	LENTO	-	+	+	+	V	+
<i>M.avium</i>	LENTO	-	-	-	+	-	+
<i>M.intracellulare</i>	LENTO	-	-	+	+	-	+
<i>M.gastri</i>	LENTO	-	-	-	-	+	+
<i>M.terrae</i>	LENTO	-	V	+	+	+	+
<i>M.trivalie</i>	LENTO	-	+	+	+	+	+
<i>M.xenopi</i>	LENTO	-	-	+	+	-	+
<i>M.ulcerans</i>	LENTO	-	-	-	+	-	+

*V: +/-

TABLA VI.- Lectura de los resultados a la tuberculinización con PPD bovina del grupo de cabras consideradas exentas de infección por *M. bovis*.

LO TE	nº cabra	Día 1º		2ª semana		4ª semana		6ª semana		8ª semana		10ª semana	
		A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.
1	1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.35	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.40
	2	0.2	0.2	0.35	0.35	0.30	0.25	0.30	0.30	0.25	0.30	0.30	0.30
	3	0.2	0.2	0.3	0.35	0.35	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
	X	0.2	0.2	0.31	0.33	0.33	0.28	0.30	0.30	0.28	0.30	0.30	0.33
2	4	0.2	0.3			0.40	0.30			0.30	0.30		
	5	0.2	0.2			0.30	0.30			0.30	0.30		
	6	0.15	0.2			0.35	0.30			0.25	0.30		
	X	0.18	0.23			0.35	0.30			0.28	0.30		
3	7	0.2	0.3					0.30	0.30				
	8	0.3	0.3					0.30	0.30				
	9	0.25	0.3					0.30	0.30				
	X	0.25	0.3					0.30	0.30				
4	10	0.25	0.2							0.30	0.30		
	11	0.20	0.3							0.30	0.40		
	12	0.25	0.3							0.35	0.40		
	X	0.23	0.26							0.31	0.36		
5	13	0.2	0.2									0.35	0.30
	14	0.25	0.3									0.30	0.30
	15	0.2	0.4									0.35	0.40
	X	0.21	0.3									0.33	0.33
6	16	0.2	0.4										
	17	0.25	0.3										
	18	0.25	0.2										
	X	0.23	0.3										
TES TI GO	19	0.2	0.3	0.25	0.30	0.35	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
	20	0.2	0.2	0.20	0.25	0.35	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
	21	0.25	0.2	0.25	0.20	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.40
	X	0.21	0.23	0.23	0.25	0.33	0.28	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.33

X = media

TABLA VII.- Lectura de los resultados a la tuberculinización con PPD aviar del grupo de cabras consideradas exentas de infección por *M.bovis*.

LO TE	nº cabra	Día 1º		2ª semana		4ª semana		6ª semana		8ª semana		10ª semana	
		A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.
1	1	0.2	0.2	0.35	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
	2	0.2	0.2	0.35	0.30	0.30	0.30	0.35	0.30	0.30	0.30	0.25	0.30
	3	0.25	0.2	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.35	0.40	0.30	0.30
	X	0.21	0.2	0.33	0.30	0.30	0.30	0.31	0.30	0.31	0.33	0.28	0.30
2	4	0.22	0.2			0.30	0.30			0.30	0.30		
	5	0.2	0.2			0.30	0.30			0.30	0.30		
	6	0.15	0.2			0.35	0.30			0.35	0.30		
	X	0.19	0.2			0.31	0.30			0.31	0.30		
3	7	0.2	0.35					0.35	0.40				
	8	0.25	0.3					0.30	0.30				
	9	0.22	0.3					0.30	0.30				
	X	0.22	0.31					0.31	0.33				
4	10	0.2	0.3							0.30	0.30		
	11	0.25	0.3							0.30	0.30		
	12	0.3	0.4							0.30	0.30		
	X	0.25	0.33							0.30	0.30		
5	13	0.2	0.2									0.30	0.40
	14	0.2	0.3									0.30	0.30
	15	0.2	0.3									0.30	0.40
	X	0.2	0.26									0.30	0.36
6	16	0.2	0.3										
	17	0.2	0.3										
	18	0.3	0.3										
	X	0.23	0.3										
TES TI GO	19	0.2	0.2	0.30	0.25	0.35	0.35	0.35	0.35	0.30	0.30	0.30	0.30
	20	0.2	0.3	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.25	0.30
	21	0.3	0.2	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.25	0.30	0.30	0.30
	X	0.23	0.23	0.26	0.26	0.31	0.31	0.31	0.31	0.28	0.30	0.28	0.30

X= media

TABLA VIII.- Resultados al ELISA con antígeno MPB70 del grupo de cabras consideradas exentas de infección por *M. bovis* tras la lectura de imtradermorreacción tuberculínica.

LO TE	nº cabra	Día 1º		2ª semana		4ª semana		6ª semana		8ª semana		10ª semana	
		A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.	A.	D.
1	1	0.003	0.001	0.000	0.006	0.003	0.003	-0.001	0.005	0.006	0.004	0.002	0.012
	2	0.003	-0.002	0.001	0.002	0.001	-0.002	0.004	0.003	0.004	0.003	-0.001	0.006
	3	0.004	0.003	0.004	0.005	0.007	0.017	-0.001	0.009	0.0012	0.009	0.019	0.011
	X	0.003	0.0006	0.0016	0.0043	0.0036	0.006	0.0006	0.0056	0.073	0.005	0.006	0.009
2	5	0.001	0.002			0.002	-0.002			0.007	0.003		
	5	-0.001	-0.002			0.001	0.001			0.004	0.003		
	6	0.003	-0.003			0.002	-0.002			0.006	0.008		
	X	0.001	-0.001			0.0016	-0.001			0.0056	0.004		
3	7	0.002	0.005					0.008	0.005				
	8	-0.001	0.002					0.000	0.004				
	9	0.000	0.001					0.002	0.004				
	X	0.001	0.0026					0.0033	0.0043				
4	10	-0.001	-0.003							0.002	-0.001		
	11	0.006	0.003							0.002	0.002		
	12	0.007	-0.004							0.003	0.002		
	X	0.004	-0.0013							0.0023	0.001		
5	13	0.005	0.005									0.008	0.008
	14	0.002	0.009									0.007	0.004
	15	0.004	-0.002									0.008	0.004
	X	0.004	0.004									0.007	0.005
6	16	-0.001	0.001										
	17	0.003	-0.002										
	18	0.005	0.004										
	X	0.0023	0.0016										
TES TI GO	19	-0.002	-0.002	0.001	0.002	0.005	-0.000	-0.001	0.006	0.004	0.004	0.005	0.004
	20	0.004	0.001	0.001	-0.001	0.000	-0.005	0.000	0.004	0.003	0.003	0.002	0.003
	21	0.000	-0.001	0.000	0.002	-0.002	-0.003	-0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.003
	X	0.0006	-0.0006	0.0006	0.001	0.001	-0.0026	-0.001	0.004	0.003	0.0033	0.003	0.003

X= media

TABLA IX.- Resultados de la tuberculinización y densidades ópticas del ELISA con los antígenos MPB70 y A60 del grupo de cabras con infección natural por *M. bovis*

Animal nº	Grosor de la piel	D.O.** MPB7 70	D.O.** A 60
1	5	0,048	0,305
2	5	0,032	0,303
3	5	0,078	0,491
4	6	0,06	0,215
5	7	0,111	0,445
6	7	0,086	0,184
7	7	0,009	0,358
8	7	0,055	0,488
9	7	0,059	0,0,275
10	7	0,095	0,398
11	7	0,126	0,504
12	7	0,105	0,511
13	7	0,096	0,511
14	8	0,136	0,49
15	8	0,025	0,428
16	9	0,119	0,5
17	9	0,108	0,322
18	9	0,105	0,425
19	10	0,061	0,119
20	10	0,187	0,427
21	10	0,08	0,163
22	10	0,021	0,33
23	10	0,094	0,464
24	10	0,151	0,149
25	11	0,145	0,427
26	11	0,017	0,103
27	11	0,031	0,017
28	11	0,224	0,531
29	11	0,191	0,445
30&	12	0,059	0,446
31&	12	0,074	0,553
32	14	0,069	0,408

Nº de animales analizados	32
Animales positivos a la	32
Animales positivos al ELISA con	19
Animales positivos al ELISA con	32

- Punto de corte para el antígeno MPB70 $\geq 0,009$

- Punto de corte para el antígeno A 60 $\geq 0,396$

** D.O.: densidad óptica medida con espectrofotómetro

*** Diferencia entre el grosor de la piel en milímetros antes y después de tuberculinizar con PPD bovina

& Animales con infección por *M. bovis* comprobada microbiológicamente

TABLA X.-Resultados de la intradermorreacción tuberculínica del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras sucesivas tuberculinizaciones con PPD bovino

DIAS DE LECTURA DE LA INTRADERMORREACCION CON PPD BOVINA	Grosor de la piel en mm 48 horas después de la intradermorreacción				
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	testigo
Día cero	3	3	3	3	3
Día 3	3,5	4	2,5	4	3
Día 9	4	2	4	4	2,5
Día 16	4	3	4	4	3
Día 30	3	3	2	3	3

TABLA XI.-Resultados de la intradermorreacción tuberculínica del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras sucesivas tuberculinizaciones con PPD aviar

DIAS DE LECTURA DE LA INTRADERMORREACCION CON PPD AVIAR	Grosor de la piel en mm 48 horas después de la intradermorreacción				
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	testigo
Día cero	3	3	3	3	3
Día 3	2.5	3.5	3	4	3
Día 9	2	3	4	4	3
Día 16	2	3.5	4	4	3
Día 30	2	2	3	3	3

TABLA XII.-Resultados a la técnica ELISA con antígeno MPB70 del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras tuberculinizaciones sucesivas

DIAS DE LECTURA DE LA INTRADERMO-RREACCION CON PPD BOVINA Y AVIAR	D O** mediante ELISA indirecto con el antígeno MPB70				
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	testigo
Día cero	0,002	-0,005	-0,002	-0,002	-0,002
Día 3	-0,003	-0,004	0,002	0	0
Día 9	0,005	-0,001	-0,002	0,001	0,001
Día 16	0,01	0,014	0,004	0,018	0,007
Día 30	0,007	0,005	0,005	0,023	0,005

-Punto de corte para el antígeno MPB70 $\geq 0,009$

**D O:densidad óptica medida con espectrofotómetro

TABLA XIII.-Resultados a la técnica ELISA con antígeno A60 del grupo de cabras con una infección natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras tuberculinizaciones sucesivas

DIAS DE LECTURA DE LA INTRADERMO- RREACCION CON PPD BOVINA Y AVIAR	D O** mediante la técnica ELISA indirecto con el antígeno A60				
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	testigo
Día cero	0,354	0,338	0,434	0,4263	0,326
Día 3	0,414	0,344	0,359	0,349	0,337
Día 9	0,373	0,338	0,281	0,415	0,332
Día 16	0,334	0,434	0,289	0,429	0,382
Día 30	0,325	0,313	0,306	0,316	0,269

-Punto de corte para el antígeno A60 $\geq 0,396$

**D O: densidad óptica medida con espectrofotómetro

TABLA XIV.- Resultados de la técnica ELISA con los antígenos MPB70 y A60 en el grupo de cabras con una infección natural por *M.avium subsp.paratuberculosis*

D.O.**MPB 70/Resultado	D.O.** A 60/Resultado
-0,003/(-)	0.411/(+)
0.001/(-)	0.421/(+)
-0.002/(-)	0.442/(+)
0.002/(-)	0.435/(+)
0.004/(-)	0.438/(+)
-0.002/(-)	0.457/(+)
-0.003/(-)	0.406/(+)
-0.001/(-)	0.433/(+)
0.001/(-)	0.406/(+)
-0.001/(-)	0.446/(+)
0/(-)	0.396/(+)
0.061*/(+)	0.404*/(+)
-0.004/(-)	0.187/(-)
-0.001/(-)	0.38/(-)
-0.001/(-)	0.401/(+)
0.008/(-)	0.489/(+)

Nº DE ANIMALES INFECTADOS POR <i>M.avium subsp.paratuberculosis</i>	15
Nº DE ANIMALES POSITIVOS AL ELISA CON ANTIGENO MPB70	0
Nº DE ANIMALES POSITIVOS AL ELISA CON ANTIGENO A60	13

- Punto de corte para el antígeno MPB70 $\geq 0,009$
- Punto de corte para el antígeno A60 $\geq 0,396$
- * Testigo de infección por *M.bovis* comprobado microbiológicamente
- ** D O: densidad óptica medida con espectrofotómetro

TABLA XV.- Resultado del chequeo serológico realizado en la isla de Gran Canaria

MUNICIPIO	NºEXPLOTACIONES ANALI/POSI	NºANIMALES ANALI/POSI(%)	TOTAL EXPLOTACION MUNICIPIO
LAS PALMAS	1/0	13/0(0%)	21
TELDE	14/9	158/21(32.8%)	57
INGENIO	1/0	17/0(0%)	21
STA.LUCIA	3/3	54/6(9.3%)	13
SAN BARTOLOME	11/6	187/14(21.8%)	15
LA ALDEA	6/4	193/11(17.1%)	35
AGAETE	10/4	75/6(9.3%)	12
GALDAR	7/2	38/3(4.6%)	32
GUIA	1/0	6/0(0%)	7
TEROR	1/1	16/3(4.6%)	10
STA.BRIGIDA	1/0	23/0(0%)	6
TOTAL ANIMALES MUESTREADOS		780	

TABLA XVI.-Numero de animales analizados por municipios y explotaciones en la isla de Gran Canaria

MUNICIPIO	Nº ASIGNADO A LA EXPLOTACION	Nº ANIMALES DE LA EXPLOTACION	TAMAÑO MUESTRA	D O MPB70 DE LAS CABRAS POSITIVAS
LAS PALMAS	1	150	13	N
TELDE	2	250	18	0.015
	3	160	11	0.012
	4	88	9	0.012 0.013 0.009
	5	69	7	N
	6	104	9	N
	7	13	4	N
	8	111	12	N
	9	30	5	0.015 0.019 0.015
	10	19	4	0.028
	11	20	5	N
	12	190	17	0.024 0.017 0.010 0.016
	13	200	17	0.027 0.049 0.009 0.009 0.011
	14	500	33	0.009
	15	50	7	0.011 0.011
	INGENIO	1	300	17
STA. LUCIA	1	800	21	0.009
	2	300	15	0.012 0.023 0.021 0.014
	3	250	18	0.010
SAN BAROLOME	1	500	25	N
	2	300	20	N
	3	500	32	N
	4	250	17	0.009
	5	1300	17	0.009 0.011 0.010
	6	200	16	0.011 0.016 0.009
	7	25	4	N
	8	250	16	0.013
	9	250	17	0.012
	10	110	11	N

	11	150	12	0.026 0.010 0.011 0.010 0.009
LA ALDEA	1	700	65	0.014
	2	1300	43	N
	3	1050	41	0.009 0.009 0.009 0.009 0.011
	4	28	16	0.012 0.011
	5	60	18	0.013 0.010 0.009
	6	100	10	N
AGAETE	1	140	13	0.017 0.011 0.009
	2	39	5	0.014
	3	19	5	N
	4	20	3	N
	5	28	5	N
	6	74	10	0.074
	7	100	10	0.016
	8	65	5	N
	9	50	6	N
	10	114	13	N
GALDAR	1	12	3	0.009
	2	24	5	N
	3	85	9	0.010 0.010
	4	24	3	N
	5	40	4	N
	6	140	9	N
	7	57	5	N
GUIA	1	40	6	N
TEROR	2	140	16	0.099 0.009 0.036
STA. BRIGIDA	3	500	23	N
TOTAL	56	12388	767	

N: ningún animal positivo en la explotación

D.O.: sólo están reflejados aquellos animales que dieron positivos mediante ELISA con antígeno MPB70.

TABLA XVII.-Resultados del muestreo serológico realizado en la isla de Lanzarote

MUNICIPIO

	EXPLORACION ANAL/POSI	EXPLORACIONES ANAL/POSI(%)	TOTAL EXPLORACION MUNICIPIO
YAIZA	12/5	107/5(11.3%)	10
TIAS	4/1	20/1(2.2%)	7
SAN BARTOLOME	3/2	26/3(6.8%)	11
ARRECIFE	7/3	81/5(11.3%)	7
TEGUISE	18/10	256/23(52.2%)	61
TINAJO	20/6	80/7(15.9%)	14
TOTAL ANIMALES CHEQUEADOS		570	

Tabla XVIII.- Número de animales analizados por municipio y explotación en la isla de Lanzarote

MUNICIPIO	Nº ASIGNADO A LA EXPLOTACIÓN	Nº ANIMALES DE LA EXPLOTACION	TAMAÑO DE LA MUESTRA	D O MPB70 DE LAS CABRAS POSITIVAS
YAIZA	1	55	5	N
	2	65	5	0.026
	3	106	9	0.012
	4	220	23	N
	5	110	9	N
	6	102	7	N
	7	26	3	N
	8	24	3	N
	9	35	3	N
	10	44	5	0.013
	11	260	25	0.014
	12	161	10	0.010
TIAS	1	83	7	N
	2	41	5	0.012
	3	23	3	N
	4	54	5	N
SAN BARTOLO ME	1	52	7	0.107 0.011
	2	136	11	N
	3	84	8	0.012
ARRECIFE	1	119	9	N
	2	179	15	0.018 0.011 0.009
	3	55	4	0.023
	4	14	2	N
	5	65	5	N
	6	650	44	0.011
	7	15	2	N
TEGUISE	1	1700	86	0.011 0.009 0.017 0.015 0.012 0.012 0.011 0.009 0.010
	2	241	15	0.009
	3	110	8	0.021 0.015
	4	89	7	N

	5	191	22	0.009 0.015 0.009 0.014
	6	85	12	0.044
	7	56	6	0.012
	8	65	5	N
	9	199	12	0.015
	10	73	23	N
	11	15	2	0.015
	12	16	2	N
	13	80	7	N
	14	51	3	N
	15	53	3	N
	16	106	25	0.010 0.012
	17	150	11	0.019
	18	84	7	N
TINAJO	1	64	5	N
	2	19	3	N
	3	19	3	N
	4	64	5	N
	5	15	2	0.019
	6	19	3	N
	7	15	2	N
	8	26	3	0.009 0.010
	9	11	2	N
	10	110	8	N
	11	93	7	N
	12	64	5	0.016
	13	26	4	N
	14	11	2	N
	15	15	2	0.010
	16	15	2	N
	17	55	5	N
	18	179	11	0.010
	19	26	3	0.009
	20	26	3	N
TOTAL	64	7014	570	

N: ningún animal positivo en la explotación.

D O : sólo quedan reflejados aquellos animales que dieron positivos mediante ELISA aon antígeno MPB70.